

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Ondřej Smolík

Studium chromozomální evoluce u *Xenopus mellotropicalis*

The study of chromosomal evolution in *Xenopus mellotropicalis*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Konzultant: Ing. Martin Knytl, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. srpna 2016

Bc. Ondřej Smolík

Poděkování

Chtěl bych poděkovat Martinu Knytlovi a Vladimíru Krylovi za odborné vedení práce, Tereze Tlapákové za pomoc a trpělivost během zaškolení k práci s buněčnými kulturami a Tereze Kratochvílové za nespočet čistých sklíček. Dále děkuji i zbývajícím členům kolektivu Laboratoře vývojové biologie za cenné rady a báječný kolektiv, který mi bude moc chybět. Velké díky patří také Vaškovi, Kateřině a Doškinovi. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině, bez jejíž podpory bych tuto práci nikdy nemohl realizovat.

Abstrakt

Evoluční vztahy karyotypů obojživelníků rodu *Xenopus* jsou intenzivně zkoumány, neboť jejich mezidruhoví variabilita a zároveň evoluční konzervovanost představují nebývalý fenomén, díky kterému lze komparativně studovat evoluční změny jako polyploidizace na chromozomální úrovni a tím lépe poznat mechanismy formující genomy v čase pomocí cytogenetických metod. Chromozomy XME (*X. mellotropicalis*, $2n=40$) byly identifikovány na základě velikostí a poměru p/q ramen a výsledné hodnoty byly srovnány s morfometrickými hodnotami *X. epitropicalis* ($2n=40$). Aplikací celochromozómových malovacích sond z mikrodisektovaných chromozómů *X. tropicalis* ($2n=20$) v rámci optimalizovaných metod malovací paint-FISH a mezidruhovému Zoo-FISH se podařilo detekovat 10 chromozomálních kvartetů a jedna balancovaná nerekiproká translokace mezi chromozómy XME 2 a XME 9, která musela proběhnout u diploidního předka. Získané výsledky vyvrací současnou teorii vzniku polyploidních druhů skupiny *Silurana* jedinou polyploidizační událostí.

Klíčová slova: FISH, *Xenopus*, chromozóm, evoluce, karyotyp, polyploidie

Abstract

The evolutionary relationships in *Xenopus* genus are intensively studied for its interspecific variability and high conservation in evolution. These characteristics possess an opportunity for comparative studying of polyploidization phenomenon on interchromosomal level and an occasion to identify the genome-forming mechanisms with cytogenetic methods. XME chromosomes (*X. mellotropicalis*, $2n=40$) were identified via p-/q- arm length ratio in a comparison with morphometric analysis of *X. epitropicalis* ($2n=40$) chromosomes. Whole chromosome painting probes were prepared from *X. tropicalis* ($2n=20$) microdissected chromosomes and they were applied to XME metaphase spreads via optimized Zoo-FISH. 10 chromosomal quartets were detected and one balanced non-reciprocal translocation between chromosomes XME 2 and XME 9 which must have occurred in a diploid ancestor. Thus, we disprove the theory of *Silurana* subgenus origin via only one polyploidization event.

Key words: FISH, *Xenopus*, chromosome, evolution, karyotype, polyploidy

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	2
3. Literární přehled.....	3
3.1. Polyploidizace	3
3.1.1. Ploidie.....	3
3.1.2. Allopolyploidie vs. autopolyploidie	3
3.1.3. Celogenomová duplikace	5
3.2. <i>Xenopus</i>	6
3.2.1. <i>Xenopus</i> jako modelový organismus.....	7
3.2.2. Fylogeneze rodu <i>Xenopus</i>	8
3.2.3. <i>Xenopus tropicalis</i>	9
3.2.4. <i>Xenopus mellotropicalis</i>	11
3.3. Metodiky užívané ke studiu karyotypu a chromozomální evoluce.....	13
3.3.1. Karyologické barvení	13
3.3.2. Pružování chromozómů	13
3.3.3. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	13
3.3.4. Sekvenování a genetické mapování	15
3.4. Vybrané studie evoluce karyotypů zaměřené na nižší obratlovce	15
4. Materiály a metody.....	19
4.1. Použité přístrojové vybavení	19
4.2. Použité roztoky.....	20
4.3. Práce s biologickým materiálem	21
4.3.1. Pokusná zvířata	21
4.3.2. Buněčné kultury	21
4.3.2.1. Příprava a kultivace	21
4.3.2.2. Příprava buněčné suspenze.....	21
4.3.2.3. Příprava preparátů metafázních figur	22
4.3.2.4. Izolace DNA z tkáně pomocí komerčního kitu	23
4.3.2.5. Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou	23
4.4. Příprava sond.....	24
4.4.1. Identifikace.....	24
4.4.2. Mikrodisekce	24
4.4.3. Primární amplifikace (WGA ₄)	24
4.4.4. Sekundární amplifikace (WGA ₃)	24
4.4.5. Ethanolová precipitace DNA.....	25
4.4.6. Příprava kompetitorové DNA	26
4.4.6.1. Autoklávováním	26
4.4.6.2. Příprava <i>X. tropicalis</i> Cot-1 DNA	26
4.4.7. Elektroforéza (ELFO)	27

4.5.	Chromozomální barvení roztokem Giemsa-Romanowski	27
4.6.	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	27
4.6.1.	Paint-FISH.....	27
4.6.2.	Zoo-FISH	28
5.	Výsledky.....	30
6.	Diskuze.....	37
6.1.	Optimalizace metod paint-FISH a Zoo-FISH	37
6.2.	Chromozomální evoluce <i>Xenopus mellotropicalis</i>	38
6.3.	Další směřování.....	40
7.	Závěr.....	41
	Seznam literatury.....	42
	Seznam online zdrojů	50
	Přílohy	51
1.	The evidence for the origin of <i>Xenopus mellotropicalis</i> via independent polyploidization event revealed by Zoo-FISH - Knytl <i>et al.</i>	51

Seznam zkratek

AFLP	„amplified fragment length polymorfism“
bp	párů bází
CGH	komparativní genomová hybridizace
CMA ₃	chromomycin A ₃
CPF	caerulein prekurzor fragment
DAPI	4-6-diamino-2-fenylindol
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
dH ₂ O	destilovaná voda
Dig	digoxigenin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dTTP	deoxythymidintrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FISH-TSA	FISH s tyramidovou signálovou amplifikací
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonová kyselina
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriální RNA
NF	Nieuwkoop Faber stádium
NOR	organizátor jadérka
paint-FISH	malovací FISH
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázové řetězové reakce
rDNA	ribozomální DNA
RNA	ribonukleová kyselina
SNP	„single nucleotide polymorphism“
SSC	„saline-sodium citrate“ pufr
TBE	Tris-borát-EDTA
TNB	Tris-NaCl blokovací pufr
TNT	Tris-NaCl-Tween pufr
UTP	uridintrifosfát
XPF	xenopsin prekurzor fragment

1. Úvod

Xenopus mellotropicalis je členem rodu *Xenopus*, podrodu *Silurana*, čeledi Pipidae; bezjazyčných vodních žab původních subsaharským mokřinám. Jako takový má potenciál prohloubit poznání evoluce tohoto významného rodu obojživelníků, který zahrnuje modelové organismy současných biologických věd, diploidní *Xenopus tropicalis* ($2n=20$) a evolučně tetraploidní *Xenopus laevis* ($2n=36$).

Sám *X. mellotropicalis* je evolučně tetraploidním druhem ($2n=40$), má tedy zdvojenou sadu chromozómů s celkovým počtem 40 chromozómů v diploidní sadě, která u čeledi Pipidae není neobvyklá. Neznámým faktem ovšem zůstává, zda se jedná o důsledek autopolyploidizací, či allopolyploidizační události a zároveň kolik takových událostí v průběhu evoluce rodu *Xenopus* nastalo. Tzn. ke zdvojení diploidní sady chromozómů mohlo dojít vlivem vnitřních biologických nebo vnějších fyzikálních či chemických faktorů; nebo vlivem mezidruhově hybridizace. Všichni obratlovci, včetně člověka, v průběhu evoluce podstoupili obdobný duplikační proces, proto je *X. mellotropicalis* ideálním nástrojem pro cytogenetické studie zaměřené na hlubší porozumění mechanismům formujícím jejich genomy. Obdobným metodickým způsobem se již podařilo v Laboratoři vývojové biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy prostudovat *X. laevis*.

Za použití fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) jsme schopni objasnit evoluční příbuznosti na chromozomální úrovni a přispět tak k porozumění fenoménu evoluce genomu duplikací včetně osvětlení evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy rodu *Xenopus*.

2. Cíle práce

1. Příprava malovacích sond *Xenopus tropicalis* pro fluorescenční hybridizaci *in situ*
2. Identifikace jednotlivých chromozómových párů druhu *X. tropicalis* metodou paint-FISH
3. Studium chromozomální evoluce mezi diploidním *X. tropicalis* a evolučně tetraploidním *X. mellotropicalis* metodou Zoo-FISH

3. Literární přehled

3.1. Polyploidizace

3.1.1. Ploidie

Za úroveň ploidie považujeme počet chromozómových sad přítomných v jedné buňce. Vyjadřujeme ji jako Xn , kdy n zastupuje jednu jejich sadu. Existují tak buňky, které lze označit jako monoploidní (n), diploidní ($2n$), triploidní ($3n$), tetraploidní ($4n$), atd. Haploidními pak označujeme buňky s poloviční sadou chromozómů. Termín polyploidie pak používáme pro buňky s počtem sad chromozómů větším než dvě.

Přirozené buněčné mechanismy ve většině případů limitují změnu ploidie pouze na meiotické dělení, kdy dochází k její redukci a vzniku pohlavních buněk. Buňka si při dělení mitózou za standardních podmínek zachovává původní počet chromozómů (Ganem a Pellman, 2007, Fox a Duronio, 2013). Výjimkou jsou například buňky jaterní, srdeční svaloviny, trofoblastu, megakaryocyty či buňky rohovky (Mattia *et al.*, 2002, Biron-Shental *et al.*, 2012, Losick, 2016).

Polyploidie na vyšší úrovni než u jednotlivých buněčných typů byla pozorována mezi živočichy u zástupců ploštěnek, kroužkovců, měkkýšů, korýšů, hmyzu, kostnatých ryb, obojživelníků a plazů (Schmid *et al.*, 2015a)*. U živočichů podstupujících pohlavní rozmnožování ovšem není zdaleka tak častá, příčinu lze proto hledat např. v přítomnosti pohlavních chromozómů (Muller, 1925). Polyploidie bývá často eliminována již v průběhu embryonálního vývoje, kdy je jí přičítáno za následek 11% spontánních potratů u lidí (Eiben *et al.*, 1990).

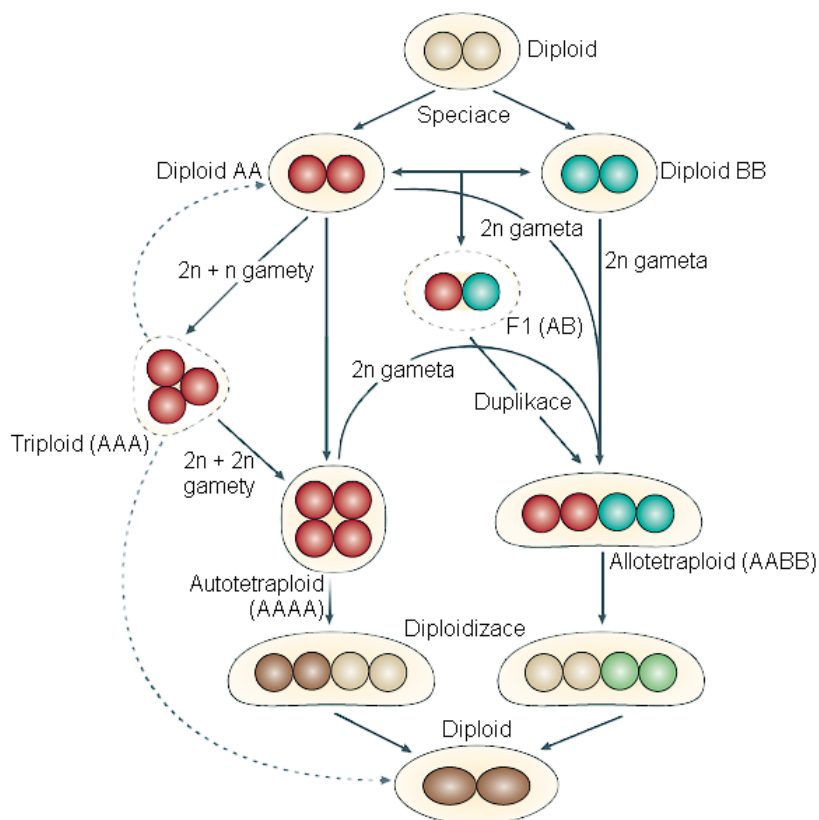
3.1.2. Allopolyploidie vs. autopolyploidie

Ke vzniku polyploidního jedince může dojít dvěma způsoby (Obrázek 1)(Schmid *et al.*, 2015a).

Allopolyploidní organismus vznikne křížením dvou rodičovských druhů s odlišnými karyotypy. Během meiotického dělení je u potomků pozorovatelné bivalentní členění.

Autopolyploidní organismus (konkrétně autotetraploidní) by vznikl za podmínky splynutí dvou diploidních gamet v tetraploidní zygotu v rámci jednoho druhu. Další z možností je

chybná první postfertilizační mitóza zygoty, při níž by nedošlo k rozdělení zduplikovaného jaderného materiálu mezi dceřiné buňky, nedošlo by totiž k cytokinezi a vzniklo by jádro se zdvojenou genetickou informací. Pokud by se navíc tento proces opakoval, může dále pokračovat v autooktoploidii. V průběhu meiózy pak pozorujeme multivalenty místo bivalentního párování.



Obrázek 1:

Schématické znázornění možného průběhu polyploidizace

Pozorujeme tři úrovně střídání ploidie v průběhu evoluce karyotypu hypotetického jedince. Zpočátku diploidní organismus prochází speciací ve dva druhy, následující úroveň se věnuje scénářům polyploidizace (pravá část nastiňuje průběh allopolyplidizace, levá autopolyploidizaci s možným scénářem i pro triploidii) a ve třetí úrovni prochází karyotyp diploidizací, již popisuje následující kapitola 3.1.3.

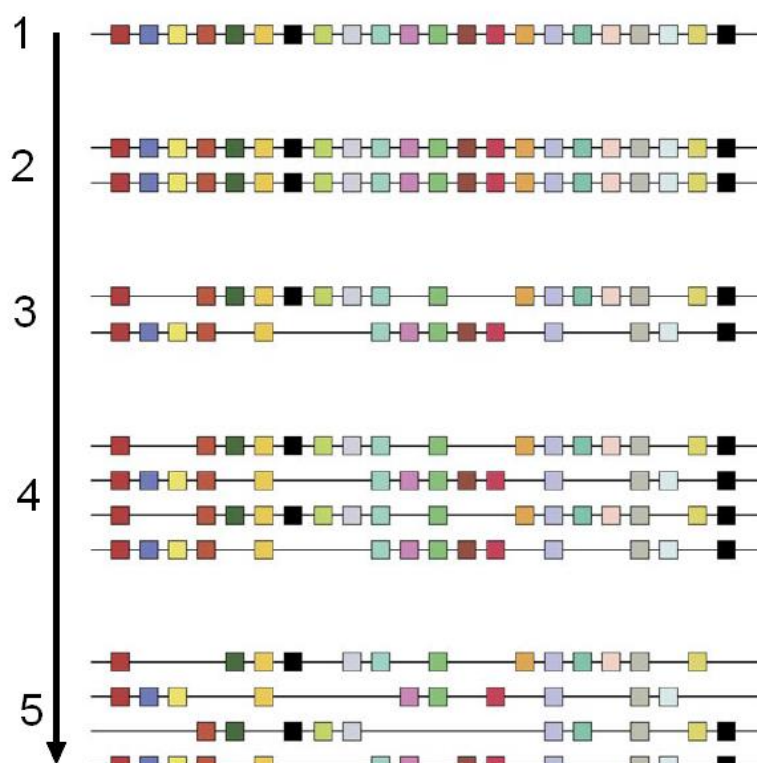
[převzato a upraveno z (Comai, 2005)].

3.1.3. Celogenomová duplikace

Celogenomová duplikace (whole genome duplication, WGD) způsobená polyploidizační událostí znamená pro nově vzniklý organismus, potažmo druh, tlak na kompenzaci dóze jednotlivých genů (Matos *et al.*, 2015). Již několik desítek let je diskutována hypotéza, zda genová duplikace není jedním z hnacích kol samotné evoluce a vzniku nových genů (Wolfe a Ó'hUigín, 2016)*.

Studie napříč říšemi dokazují, že k celogenomové duplikaci docházelo v průběhu evoluce současných druhů rostlin (Zhan *et al.*, 2016), kvasinek (Kellis *et al.*, 2004), obratlovců (Spring, 1997, Dehal a Boore, 2005) a to i opakovaně (Obrázek 2).

Proces reakce na celogenomovou duplikaci označujeme jako diploidizaci. Ta je provázena ztrátou velkého množství genů a dochází v něm k četným chromozomálním přestavbám všech typů (Paterson *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2005, Gaeta *et al.*, 2007). Genom má tak tendence navracet se zpět do diploidního stavu.



Obrázek 2: Schématické znázornění dvou následujících celogenomových duplikací předpokládaných v evoluci obratlovců

(1) Hypotetický genom o 22 genech, (2) WGD generuje kompletní dvojsadu genů, (3) duplikovaný genom prochází diploidizací a zároveň ztrácí některé geny, (4) další WGD duplikuje aktuální stav genomu, (5) následuje opět proces diploidizace [převzato a upraveno z (Dehal a Boore, 2005)].

Diploidizované genomy se vyznačují tendencí navracet se v průběhu meiózy k formování bivalentů, je proto nezbytné mezi homeologními chromozómy ustavení částečné strukturní heterogenity v centrické a pericentrické oblasti (Schmid *et al.*, 1985). Dalším znakem takových genomů je redukce počtu aktivních organizátorů jadérka inaktivací, nebo kompletní delecí ribozomálních cistronů (nucleolar organizing region, NOR) (Tymowska a Fischberg, 1982, Tymowska, 1991).

Na otázku, zda celogenomová duplikace znamená jasný přínos a evoluční akceleraci či naopak, se dosud nepodařilo přesvědčivě odpovědět a je tak předmětem dalších výzkumů (Levy a Feldman, 2002).

Pseudogenizace je nejčastějším krokem, kterým je naloženo s genem po duplikaci. Pokud nadpočetný gen není pod selekčním tlakem (Nowak *et al.*, 1997), stává se během několika milionů let pseudogenem a je umlčen (Lynch a Conery, 2000). Může k tomu dojít prostřednictvím mutací a delecí, které se akumulují; takto změněný gen v genomu zůstává přítomen, přestože postrádá expresi či funkci. Po dlouhodobém vývoji může být nakonec z genomu úplně odstraněn (Rouquier *et al.*, 2000), nebo naopak může ve vzácných případech disponovat funkcí (Ota a Nei, 1995).

Duplikovaný gen může být ale také konzervován, pokud přináší zvýšenou úroveň vlastní exprese výhodu, kterou se vyplatí zachovat, jako je tomu např. u ubiquitinu negativní selekcí (Nei *et al.*, 2000) či společnou evolucí ribozomálních RNA (Drouin a de Sá, 1995).

Subfunkcionalizací duplikovaného genu dochází k fixaci dvou variant genu, které v průběhu evoluce diferencují svou funkci (Force *et al.*, 2005) jako v případě tkáňově specifických transkripčních faktorů (Canestro *et al.*, 2005).

Nejpodstatnějším důsledkem genové duplikace je však neofunkcionalizace; jeden ze dvou duplikovaných genů získává vlivem mutace zcela odlišnou funkci, zatímco druhý gen si ponechává tu původní. Tento proces může volně navazovat na subfunkcionalizaci (Rastogi a Liberles, 2005), taková skutečnost byla doložena studií ortologních genů *X. laevis* a kostnatých ryb (Semon a Wolfe, 2008).

3.2. *Xenopus*

Tato kapitola se věnuje předmětu zájmu této studie, shrnuje nejpodstatnější informace o vybraném rodu, zahrnuje esenciální fakta a formuje tak smysl předkládané práce.

Žáby rodu *Xenopus*, neboli drápatky, označované takto z důvodu přítomnosti charakteristických výrůstků na prstech dolních končetin, přirozeně obývají mokřady subsaharské Afriky. Jedná se o bezjazyčné jedince žijící ve výhradně vodním prostředí a živící se všežravě.

3.2.1. *Xenopus* jako modelový organismus

První velký zájem o žáby rodu *Xenopus* vyvstal již ve 40. letech 20. století, kdy po několik následujících desítek let představovaly jednu z nejefektivnějších možností testování časné gravidity u žen. Pokud po injekci vzorku koncentráту moči pacientky do břišní dutiny samic žab došlo do dvanácti hodin k ovulaci a drápatka nakladla snůšku čerstvých oocytů, byl v moči přítomen gonádotropní hormon a test pak bylo možné označit jako pozitivní. Drápatky tak nahradily modelové organismy jako myši a králíky, které byly dříve užívány pro testování s mnohem menší přesností či efektivitou a naopak s většími chovnými nároky (Polack, 1949).

Mezi zástupci rodu *Xenopus* nalezneme hned dva klíčové modelové organismy experimentální vývojové biologie, *Xenopus laevis* (drápatku vodní) a *Xenopus tropicalis* (drápatku tropickou).

Hlavními výhodami obojživelníků jakožto modelů v experimentálních přístupech je například možnost časté hormonálně indukovatelné ovulace produkující stovky až tisíce oocytů velikostně přístupné transplantačním či mikroinjekčním zásahům; vnější oplození usnadňující IVF (*in vitro* fertilizace) a tím také synchronizaci embryonálního vývoje všech jedinců v rámci jednoho experimentu; embryogeneze *ex vivo* umožňující pozorování díky průhlednosti po spotřebování zásobních žloutkových granul embryem, studium řady vnějších vlivů na vývoj jedince a rovněž transplantační či chirurgické zásahy (Kashiwagi *et al.*, 2010).

Zásluhou obojživelných modelů se v průběhu posledních 100 let podařilo objasnit řadu esenciálních biologických mechanismů a fenoménů, které mají dalekosáhlý impakt na moderní primární i aplikovaný výzkum. Jejich významnost dokládá udělení dvou Nobelových cen za fyziologii a lékařství. První v roce 1935 německému embryologovi Hansi Spemannovi za objev organizátoru, dorzálního rtu blastoporu zastupujícího zásadní roli v průběhu gastrulace obratlovců (Spemann a Mangold, 2001), druhá v roce 2012 britskému vývojovému biologovi Johnu Gurdonovi za studium přenosu jader terminálně diferencovaných somatických buněk a jejich následné reprogramace do pluripotentního stavu (Gurdon, 1962).

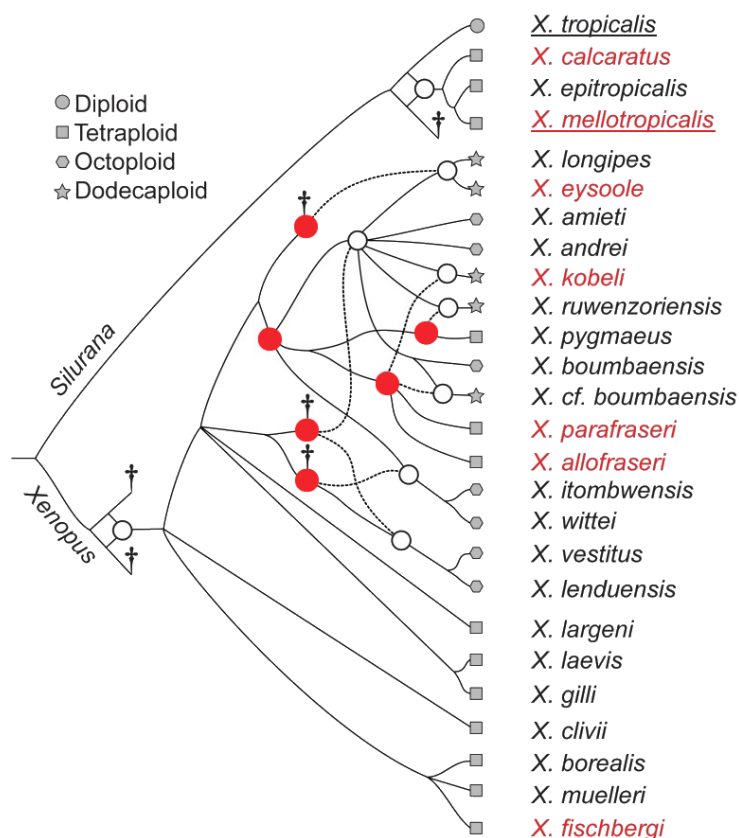
Drápatky byly dále užity k velice detailnímu popisu ontogenetického vývoje dle Nieuwkoop a Faber (Xenbase.org, 2016); vzniklý NF systém skýtá 66 stádií obsahujících vizuální popis z různých pozorovacích perspektiv. Výše zmíněné oocyty, produkované v nadbytku řízenou ovulací, je také možné využít jako kompletní výkonný transkripční, resp. translační systém pro transkripci libovolné DNA či translaci libovolné mRNA, kterou je možné jednoduše vpravit do oocytu mikroinjikováním (Gurdon *et al.*, 1971, Mertz a Gurdon, 1977).

3.2.2. Fylogeneze rodu *Xenopus*

Fylogeneticky rod *Xenopus* řadíme do třídy Amphibia (obojživelníci), řádu Anura (žáby), čeledi Pipidae (pipovití) (de Sa a Hillis, 1990), Uniprot.org, 2016).

Samotný rod vznikl zhruba před 90 miliony let, což ho časově staví na úroveň vedle prvních placentálních savců. Na rozdíl od savců je ovšem v evoluci morfologie těla těchto žab velmi konzervovaná a naopak jsou jeho jednotlivé druhy na úrovni organizace genomu velmi odlišné (Bisbee *et al.*, 1977)*.

Na základě fylogenetických studií rodin albuminových proteinů a genů mtDNA se podařilo identifikovat dvě sesterské podskupiny drápatek, k jejichž evolučnímu oddělení došlo přibližně před 20-50 miliony let (Evans, 2008). Jednou z nich je *Silurana*, u jejích kořenů stojí hypotetický diploidní předek s celkovým počtem 20 chromozómů ($2n=20$), kam řadíme *Xenopus tropicalis*, *X. epitropicalis* a nově *X. mellotropicalis* a *X. calcaratus*. Druhou je stejnojmenná skupina *Xenopus*, do které spadá právě *X. laevis* a většina dalších tetraploidních, oktoploidních či dodekaploidních druhů. Ty se evolučně odvíjí od hypotetického předka, který v diploidní sadě disponoval 18 chromozómy ($2n=18$) (Bisbee *et al.*, 1977, Tymowska a Fischberg, 1982, Evans *et al.*, 2004, Evans *et al.*, 2015). Následující fylogenetický strom (Obrázek 3) shrnuje aktuálně popsané druhy a nese informace o úrovni ploidie každého z nich.

**Obrázek 3:**

Fylogenetický strom rodu *Xenopus*

Schéma zahrnuje aktuálně popsané druhy drápatek, symboly před jejich jménem vyjadřují úroveň ploidie každého druhu.

Červené kruhy zastupují známé evoluční předky vývojových linií, bílé kruhy allopolyploidizační události, kříže pak vyhynulé zcela neznámé předky.

Červeným písmem jsou označeny druhy popsané v roce 2015, potvrzením jsou zvýrazněny druhy klíčové pro tuto studii [převzato a upraveno z (Evans *et al.*, 2015)].

Předpokládá se tedy, že v rámci evoluce druhů tohoto rodu došlo k minimálně dvěma tetraploidizacím, třem oktoploidizacím a třem dodekaploidizacím nezávisle na sobě. To vše s upřednostněním allopolyploidizačního scénáře nad autopolyploidizačním (Evans *et al.*, 2015). Jako důvod vizualizované sítě příbuzností mezi nimi a komplexity v počtu chromozómů se uvádí kombinování bifurkačního a retikulačního scénáře. To si lze představit tak, že hypotetický předek v průběhu speciace dá vzniknout dvěma populacím, které po čase dosáhnou dostatečné míry odlišnosti a lze je označit za samostatné druhy (bifurkace). Nicméně nejsou evolučně vzdáleni natolik, aby nemohlo dojít k jejich křížení a vzniku hybridu kombinací jejich genomů (retikulace), který navzdory předpokladům Haldaneova pravidla hybridní sterility zůstává plodným (Forsdyke, 2000, Evans, 2008).

3.2.3. *Xenopus tropicalis*

Xenopus tropicalis (Western clawed frog), neboli drápatku tropickou, lze v současné době označit za jeden z nastupujících modelových organismů experimentální biologie. Přestože

většina již zmíněných studií byla doposud prováděna na *X. laevis*, v posledním desetiletí se kvůli limitacím zmíněného modelu přistupuje k využití právě drápatky tropické.

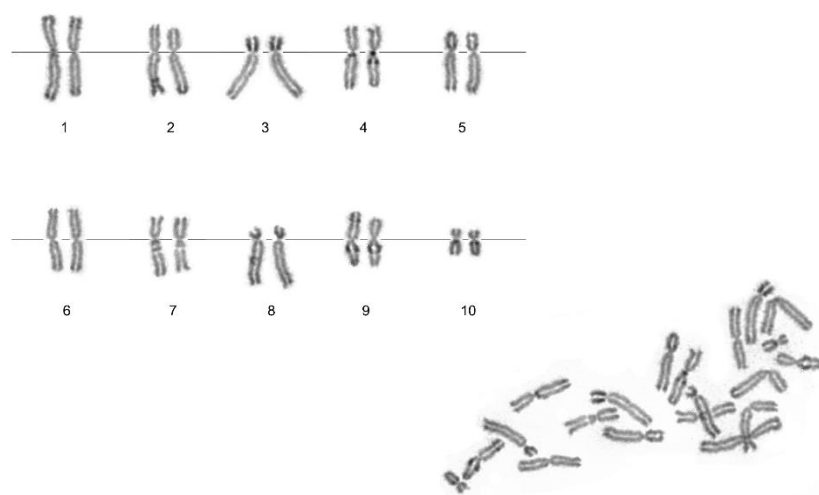
Oproti *X. laevis* má totiž *X. tropicalis* několik charakteristik, které jsou z pohledu současné experimentální metodiky neopomenutelné.

Jedinci *X. tropicalis* jsou totiž menší, měří zhruba 5 cm, a velmi rychle dosahují pohlavní zralosti. Jejich generační doba je přibližně 4 měsíce. V jedné snůšce mohou naklást až několik tisíc oocytů, které se velikostně příliš neliší od jiných druhů. Chov je možné uskutečnit při běžné pokojové teplotě (Hirsch *et al.*, 2002)*.

Jedná se navíc o jediný druh drápatek, který je diploidní (Evans *et al.*, 2004). S tím souvisí menší velikost genomu činící 1,7 Gbp, ten byl v roce 2010 kompletně osekvenován (Hellsten *et al.*, 2010). Tyto skutečnosti umožňují řadu genetických studií, transgenezi či genetické mapování. Jedna z detailnějších map genomu byla dokončena o rok později (Jiang *et al.*, 2011).

Díky rozsáhlejšímu poznání příbuznosti mezi jednotlivými chromozómy v závislosti na konstrukci genetických map vyvstala otázka týkající se chromozómové nomenklatury zavedené z následujícího popisu.

Karyotypicky byl *X. tropicalis* popsán poprvé v roce 1973 s cílem srovnat jej s dosud známými karyotypy dalších pipovitých žab jako *X. laevis* ($2n=36$) či *X. muelleri* ($2n=36$). Kompletní karyotyp *X. tropicalis* činí 20 chromozómů ($2n=20$) (Obrázek 4) bez morfologických známek rozlišení pohlavních chromozómů, během meiotické metafáze II chromozómy formují 10 bivalentů. Srovnáním relativních délek chromozómů všech tří druhů zmíněných ve studii bylo prokázáno, že součet délek všech chromozómů *X. tropicalis* odpovídá přibližně polovině obou srovnávaných karyotypů. Chromozómy byly očíslovány na základě vztahů relativních délek krátkých a dlouhých ramen (Tymowska, 1973). Tato nomenklatura byla užívána následujících téměř 40 let, než došlo ke konvenčnímu přecíslování podloženému délkou celého chromozómu; u chromozómů o stejné délce má v číslování přednost případně ten, jehož poměr se více blíží metacentrickému indexu poměru p-/q- ramen (Khokha *et al.*, 2009).

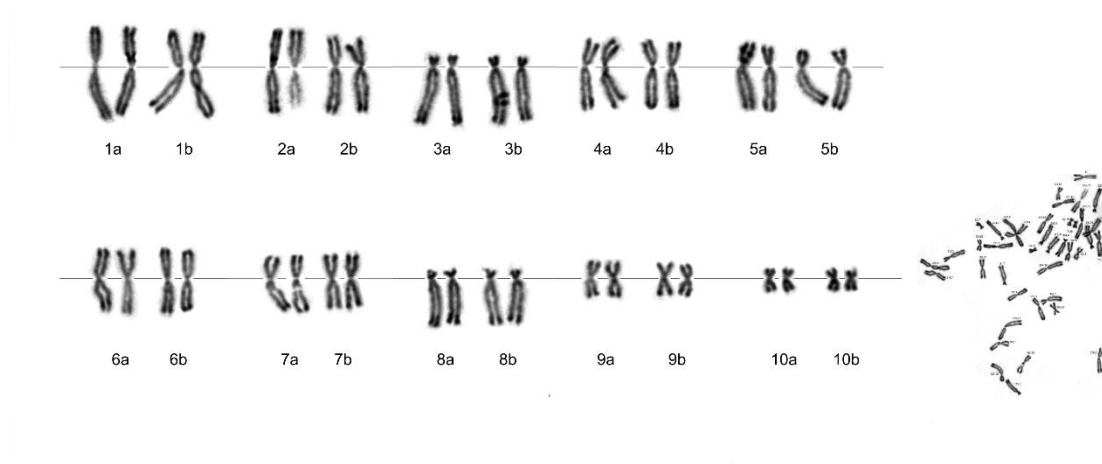


Obrázek 4: Karyotyp *Xenopus tropicalis* – 20 chromozómů v diploidní sadě ($2n=20$), řazeno podle současné nomenklatury

3.2.4. *Xenopus mellotropicalis*

Xenopus mellotropicalis (Gabonese clawed frog) je jedním z nově popsáných druhů drápatek (Evans *et al.*, 2015). Poprvé byl však zmíněn již jako kamerunský *Xenopus species nova VII* (Graf a Fischberg, 1986) a následně taxonomicky zařazen do skupiny *Silurana* (Tymowska, 1991). Později byl označován také jako *X. paratropicalis* (Flajnik *et al.*, 1993), nicméně tento název neodpovídal korektnímu zoologickému názvosloví a přestal být používán (Schmid a Steinlein, 2015)*. S odstupem času byl funkčně označen jako *X. new tetraploid 1* (Evans *et al.*, 2004), dokud nebyl oficiálně znovu popsán v roce 2015.

Jeho karyotyp obsahuje 40 chromozómů ($2n=40$) (Obrázek 5). Bez podrobnější analýzy je tak velmi podobný karyotypu dalšího tetraploidního druhu podskupiny *Silurana*, *X. epitropicalis* (Tymowska a Fischberg, 1982).



Obrázek 5: Karyotyp *Xenopus mellotropicalis* – 40 chromozómů v diploidní (evolučně tetraploidní) sadě ($2n=40$), řazeno podle současné nomenklatury

Bylo rovněž prokázáno, že obsah kožního sekretu *X. mellotropicalis* podobně jako u příbuzných žabích druhů je obohacen o antimikrobiální a hemolytické druhy peptidů (Mechkarska *et al.*, 2011) s potenciálními účinky aplikovatelnými v medicíně jako antivirotika či k cílené léčbě rakoviny. Tyto peptidy označované jako caerulein precursor fragment (CPF) a xenopsin precursor fragment (XPF) jsou produkty posttranslačního zpracování proteinů podobných margainu-1 a -2 identifikovaného u *X. laevis* (Conlon a Mechkarska, 2014)*. Srovnáním proteinových sekvencí byly zjištěny odlišnosti v N-terminální doméně, které byly přisouzeny několika duplikačním událostem v průběhu evoluce původního genu (Hunt a Barker, 1988).

Nedávná analýza druhů ze skupiny *Silurana* (jmenovitě *X. tropicalis*, *X. epitropicalis* a *X. mellotropicalis*) metodou C-pruhování a replikačního pruhování metafázních chromozómů přinesla důkaz o vysoce blízké homologii všech 10 chromozomálních párů a kvartetů všech zmíněných druhů. Drobné nuance ve výsledném pruhování byly přisouzeny rozdílné replikační rychlosti eu- a heterochromatinu. Na základě těchto zjištění lze formulovat hypotézu o extrémně blízké příbuznosti diploidních předků těchto tří druhů, kdy je možné v případě jejich evoluce připustit i mnohem méně předpokládanou autopolyploidii (Schmid *et al.*, 2015a, Schmid a Steinlein, 2015).

3.3. Metodiky užívané ke studiu karyotypu a chromozomální evoluce

Závěrečná kapitola literárního přehledu představuje metody používané ke studiu chromozomální evoluce a na vybraných publikacích předkládá jejich funkční aplikace s důrazem na *in situ* hybridizace.

3.3.1. Karyologické barvení

Nejčastější technikou prvotní vizualizace chromozómů je barvení roztokem Giemsa-Romanowski, který vizualizuje celé metafázní chromozómy (Sumner, 1972). Pomocí techniky barvení stříbrem, resp. AgNO_3 , je možné na chromozómech vizualizovat NOR obsahující úseky ribozomálních cistronů (Hubbell a Hsu, 1977).

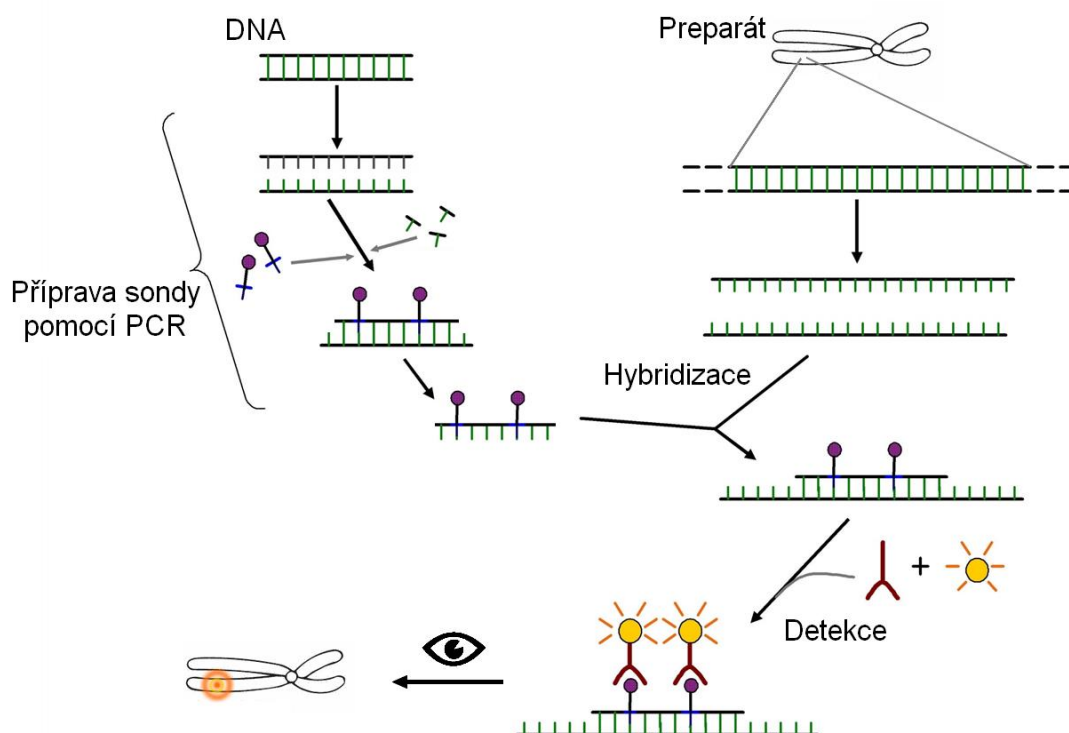
3.3.2. Pruhoání chromozómů

Pruhoání je technikou zvýrazňující odlišné oblasti na chromozómech. Výsledný vzor se pak jeví jako pruhy rovnoběžně orientované s osou procházející centromerou mezi krátkými a dlouhými rameny chromozómu. Např. složení GC- a AT- bohatých oblastí lze vizualizovat pomocí kombinované aplikace fluorochromů (tzv. fluorescenční bandování) chromomycinu A_3 (CMA_3) a 4-6-diamino-2-phenylindolu (DAPI), kdy CMA_3 barví GC- oblast a DAPI AT- oblast (Schweizer, 1980). C-pruhoání umožňuje zviditelnit části chromozómů obsahující konstitutivní heterochromatin přítomný často v centromerách (Schmid *et al.*, 2015b). Výsledky pak slouží především k vizuálnímu srovnání karyotypů, příp. jako první signál rozsáhlejších chromozomálních přestaveb.

3.3.3. Fluorescenční *in situ* hybridizace

Metoda FISH je založena na dvou esenciálních vlastnostech nukleových kyselin; zaprvé na denuraci a zpětné renaturaci a zadruhé na komplementárním párování antiparalelních vláken. Působením zvýšené teploty dochází ke změně konformace a přerušení vodíkové vazby mezi jednotlivými bázemi antiparalelních vláken, čímž je umožněn přístup dalším molekulám. Ze směsi izolované DNA/RNA, jednotlivých bazí a termostabilní polymerázy je tak možné pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) připravit krátké sondy (řádově o stovkách bp) zna-

čené často analogem jedné z bazí, která je do směsi přidána v poměrném množství k bázi, kterou substituuje. Sondu je potom možné za obdobných teplotních podmínek hybridizovat na cílový preparát tzv. *in situ* neboli „na místě“. Inkorporovaný analog jedné z bazí lze nakonec detekovat pomocí fluorescenčně značené protilátky za použití fluorescenčního mikroskopu (Obrázek 6).



Obrázek 6: Příklad průběhu vybraného druhu fluorescenční hybridizace *in situ* (přejato a upraveno z Wikipedia, 2016)

V rámci cytogenetických aplikací má tato metoda širokou škálu specializačních variant jako jsou malovací paint-FISH (Kretschmer *et al.*, 2015), mezidruhová Zoo-FISH (Bugno-Poniewierska *et al.*, 2014), FISH-TSA (tyramide signal amplification) se signálovou amplifikací (Acar *et al.*, 2002), genomová GISH (genome in situ hybridization) (Piperidis, 2014), srovnávací CGH (comparative genome hybridization) (Rack *et al.*, 2016) a jako takové nacházejí uplatnění i v řadě biomedicínských aplikací. Metoda je také alternativou k vizualizaci rDNA mimo barvení stříbrem (Pinkel *et al.*, 1986).

3.3.4. Sekvenování a genetické mapování

Studovat chromozomální evoluci lze i s pomocí znalosti samotných sekvencí. Analýzou sekvenčních dat a jejím porovnáním s jinými příbuznými druhy lze identifikovat rozsáhlé události jako celogenomové duplikace (Christoffels *et al.*, 2004). Se znalostí polohy daných genů a následným srovnáním s jeho polohou u příbuzného druhu je možné určovat scénáře vývoje karyotypu v průběhu evoluce celých vývojových linií či pouze fenotypových variant zkoumaného druhu (Bian *et al.*, 2016).

3.4. Vybrané studie evoluce karyotypů zaměřené na nižší obratlovce

Uno *et al.* v roce 2015 publikovali studii zaměřenou na evoluci pohlavních chromozomů s využitím řady cytogenetických technik. Pomocí FISH lokalizovali 5 funkčních genů ve scaffoldech spojených s definicí pohlaví u *X. tropicalis*. S jejich pomocí realizovali genetické mapování u dalších tří žabích druhů, *X. laevis*, *R. rugosa*, a *B. buergeri*, a srovnali je s předchozími mapami prvních tří zmíněných druhů. Dále uskutečnili CGH samčího a samičího genomu a také paint-FISH s pomocí sondy připravené z mikrodisektovaného W chromozómu *B. buergeri*. Podařilo se tak u *B. buergeri* identifikovat homomorfní chromozóm nesoucí pohlaví určující oblast a pomocí genetického mapování určit možné scénáře jeho evoluce zahrnující inverze, změny polohy centromer a rozpady, čímž byla potvrzena rozmanitost evoluce žabích pohlavních chromozomů. V neposlední řadě se podařilo identifikovat jeden z genů ovlivňující vývoj pohlaví, jehož evoluční amplifikace umožnila následnou subfunkcionalizaci v různých lokusech. Gen se později stal ve svých variantách specifickým pro oba typy gamet (Uno *et al.*, 2015).

Využitím sekvenování a následných mapovacích analýz se rovněž podařilo identifikovat chromozomální příbuznost a rozšířit evoluční znalost kostnatých ryb na základě konstrukce druhé nejobsáhlejší obratlovčí meiotické mapy, a to u akvarijní ryby platy skvrnitě (*X. maculatus*). Jako referenční druhy byly využity medaka (*O. latipes*), koljuška (*G. aculeatus*), čtverzubec (*T. nigroviridis*), dánio (*Danio rerio*) a člověk. Podařilo se ukázat velice evolučně stabilní části genomů, které v obdobném stavu vydržely více než 300 milionů let. Naopak se také podařilo detekovat dvě nezávislé události chromozomální fúze dvou chromozomů se stejným evolučním původem u čtverzubce a platy. Zároveň byl potvrzen fakt, že v genomech jsou mnohem častěji fixovány transpozice a inverze, než samotné translokace (Amores *et al.*, 2014).

Recentní studie genetického mapování přinesla metodiku aplikovatelnou i na živočichy s velice rozsáhlým genomem, v porovnání c-value s *X. laevis* více než dvanáctkrát větším (Genomesize.com, 2016). Mapa příbuznosti vybraných genů ze samice čolka zelenavého (*N. viridescens*) odchycené ve volné přírodě a jejích 29 embryí ze dvou paternálních linií byla připravena pomocí sekvenování RNA knihoven, na jejichž základě byla identifikována řada paternálních a maternálních SNP a 24 disektovaných chromozómů. S využitím více než 2000 markerů byla následně srovnána poloha ortologních genů s mapou axolotla, drápatky a kura. Podařilo se tak potvrdit, že evoluční nárůst velikosti genomu u čolka notně navýšil počet meiotických rekombinací, dále také rozsáhlou konzervaci ve vybraných segmentech, přispět v poznání vztahů kuřecích mikro- a makrochromozómů a konvergentní evoluci kompaktních genomů drápatek a čolků (Keinath *et al.*, 2016).

Technika pruhování a vizualizace ribozomální DNA bývá široce využívána k rozsáhlým popisům různých druhů živočichů. K charakterizaci vztahů mezi karyotypy dvou druhů ryb rodu *Astyanax* bylo použito C-pruhování, barvení stříbrem a fluorochromy a metoda FISH využívající 18S rDNA sondu. Studie ukázala, že počet NOR a jejich poloha mohou fungovat jako markery specifické pro druh a zároveň se jejich počty mohou lišit mezi jednotlivými populacemi, což rovněž potvrdily výsledky rDNA FISH. Ukázalo se také, že rDNA nemusí vždy místně odpovídat poloze NOR. Charakteristické GC- a AT-bohaté oblasti detekované pomocí fluorochromů a vizualizace konstitutivního heterochromatinu sloužily jako důkaz příbuznosti s jinými zástupci rodu. Cytogenetické techniky v tomto případě posloužily jako ideální nástroj k rozlišení dvou druhů, které morfologicky téměř nelze odlišit, a potvrdily tak svou významnost pro správné fylogenetické členění organismů (Da Silva *et al.*, 2016).

Podobným způsobem bylo využito barvení stříbrem a C-pruhování k identifikaci rozdílů mezi dvěma druhy akvarijských ryb *Satanoperca*, které se primárně liší pouze zbarvením, a na něm byla dosavadní taxonomie postavena. Metoda FISH byla využita ke srovnání polohy 5S a 18S rDNA. Zatímco počet chromozómů a lokalizace 5S rDNA byla u obou druhů shodná, poloha heterochromatinu a 18S rDNA se lišila. V některých metafázních figurách jednoho z druhů byl navíc vizualizován B chromozóm. Výsledky tak potvrdily příslušnost k jednomu rodu a osvětlily evoluční změny v karyotypech, které mohou souviset s odlišným zbarvením (Silva *et al.*, 2016).

Pomocí mezidruhového Zoo-FISH se podařilo potvrdit allotetraploidní původ *X. laevis* detekcí chromozomálních kvartetů s využitím celochromozómových malovacích sond z diploidního *X. tropicalis*. Klíčová byla vizualizace nerekiproké translokace detekované pomocí

sondy z nejmenšího chromozómu 10, jejíž signál neodpovídal detekovaným kvartetům. Bylo tak hypotetizováno, že k translokaci došlo během dvou nezávislých polyploidizačních událostí a to u dvou různých předků (Krylov *et al.*, 2010). Pozdější studie založená na FISH a genetickém mapování odhalila fúzi zmíněného chromozómu 10 a 9 u diploidního předka *X. laevis* (Uno *et al.*, 2013).

Specializovaný protokol FISH-TSA umožňuje lokalizovat jediný gen v rámci celého karyotypu a to díky tyramidové amplifikaci signálu. Touto metodou byl zviditelněn například gen mitochondriální dehydrogenázy, čímž byla verifikována jeho poloha u *X. tropicalis* ve dvou kopiích (Krylov *et al.*, 2007) a *X. laevis* ve čtyřech kopiích (Tlapakova *et al.*, 2005). Metodiku tak lze využít ke komparativnímu genetickému mapování.

U druhu evropských karasů *C. gibelio* se povedlo díky FISH identifikovat mikrochromozómy, které mohou být odpovědné za determinaci pohlaví u těchto ryb. Specifická samčí sekvence, nalezená pomocí AFLP (amplified fragment length polymorfism), by se mohla vyskytovat právě na mikrochromozómech. To se s využitím FISH ale nepodařilo prokázat. Hormonálním působením byly však úspěšně produkovány fyziologické samice, jejichž gynogeneze (samičí partenogeneze, kdy se jedinec vyvine pouze ze samičí gamety) dala vzniknout opět samcům s mikrochromozómy obsaženými v karyotypu. Potvrzení lokalizace těchto sekvencí tak čeká na výsledky kompletní sekvenace (Li *et al.*, 2016).

Metodou GISH, kdy dochází k hybridizaci celogenomové sondy na chromozómy jedince jiného, byl studován vztah mezi karyotypy dvou druhů karasů odchycených ve volné přírodě. Jedna samice *C. gibelio* z celkového počtu 27 disponovala 206 chromozómy oproti ostatním se 156. Karyotyp druhého zástupce, *C. carassius*, běžně obsahuje 100 chromozómů. Hybridizací byl odhalen allotetraploidní původ samice s disproporčním karyotypem pro vybranou populaci, kdy 3n tvořily sady *C. gibelio* a 1n sada *C. carassius*. Následným sekvenováním a studiem přítomných mitochondriálních genů byl prokázán původ 3n sady maternální linie a 1n sady paternální. Povedlo se tak demonstrovat u ryb fenomén rozmnožování gynogenezí, během které byl samčí genom inkorporován do genomu nově vzniklého allotetraploidního potomka, tzv. adicí spermatického genomu, jež u podobných druhů ryb není neobvyklá (Knytl *et al.*, 2013).

Další studií aplikací metody GISH se podařilo u amerických axolotlů *Ambystoma* detekovat mezigenomické záměny v několika verzích v rámci populace čtyř druhů. Byly popsány raritní chromozomální vztahy označované jako kleptogeneze, kdy samice jednopohlavního

druhu využívá k oplození spermie druhu jiného, přičemž výsledný karyotyp může i nemusí zahrnovat haploidní sadu donora spermie. To vše vede v kombinaci se ztrátami chromozómů a premeiotickou endomitózou (před iniciací meiózy dochází k mitóze bez cytokineze, vznikají tak oocyty geneticky shodné se somatickými buňkami) k extrémní variabilitě v úrovních ploidie mezi jednotlivými generacemi a také k mnoha kombinacím genomů axolotlích druhů (Bi *et al.*, 2009).

4. Materiály a metody

4.1. Použité přístrojové vybavení

autokláv Chirana PS 20A

centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 32R

cykler XP Bioer

flow box EM Box 120 Schoeller Instruments

fluorescenční mikroskop Olympus BX40F

inkubátor Laboratorní přístroje Praha

inkubátor MCO-19 AIC Sterisonic UVH Panasonic

inverzní mikroskop Wilovert WILL Wetzlar

Nanodrop ND-1000

stolní centrifuga MiniSpin Plus Eppendorf

stolní třepačka Minishaker MS1 IKA Schoeller Instruments

suchý blok Thermostat TDB-120 Biosan

Thermoclock digital Vezas

UV Transiluminátor TS-20E UVP

vodní lázeň Techne TE-10D Tempette

vortex Mixer Velp Scientifica

zdroj Power station 300 Labnet Internacional

4.2. Použité roztoky

10x PBS (pH=6,7, V=1 l)

- 79 g NaCl
 - 29 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
 - 3,1 g KH_2PO_4
 - 1,1 g KCl
 - dolito do 1 l dH_2O
- pro 1x PBS ředěno 10-krát
pro 2/3 PBS ředěno 1x PBS s dH_2O
v poměru 2:1 (V/V)

TNES (pH=7,5, V=100 ml)

- 5 ml 1M Tris (pH=7,5)
- 8 ml 5M NaCl
- 20 ml 0,5M EDTA
- 5 ml 10% SDS
- 65 ml destilované vodou

0,5M EDTA (pH=8, V=50 ml)

- 9,3 g EDTA
 - dolito do 50 ml dH_2O
- (pro 1M dolito do 25 ml dH_2O)

TE (pH=8, V=200 ml)

- 2 ml 1M Tris-HCl, pH=8
- 400 μl 500mM EDTA, pH=8
- 197,5 ml dH_2O

100mM KCl (pH=7,2, V=100 ml)

- 0,746 g KCl
- 0,119 g HEPES
- 0,038 g EGTA
- dolito do 100 ml dH_2O

20x SSC (pH=7,0, V=400 ml)

- 70,13 g NaCl
 - 35,29 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - dolito do 400 ml
- pro 2x SSC ředěno 10-krát

5x TBE (V=5l)

- 270 g Tris-báze
- 137,5 g H_3BO_3
- 18,5 g EDTA
- dolito do 5 l dH_2O

pro 1x TBE ředěno 5-krát

10x TNT (pH=7,5, V=400 ml)

- 48,44 g Tris-báze
 - 35,064 g NaCl
 - 2 ml Tween 20
 - dolito do 400 ml dH_2O
 - filtrováno
- pro 1x TNT ředěno 10-krát

TNB (pH=7,5, V=300 ml)

- 3,63 g Tris-báze
- 2,63 g NaCl
- 1,5 g Blocking reagent
- dolito do 300 ml dH_2O
- filtrováno

1M Tris-HCl (pH=8, V = 100 ml)

- 12,1g Tris-báze
- dolito do 100 ml dH_2O

4.3. Práce s biologickým materiálem

4.3.1. Pokusná zvířata

Zvířata *X. tropicalis* (kmen Ivory Coast) pocházela z chovu Přírodovědecké fakulty UK. Jedinci *X. mellotropicalis* byli poskytnuti na základě spolupráce z chovu dr. Bena Evanse, z McMasterovy univerzity v Hamiltonu, Kanada.

4.3.2. Buněčné kultury

4.3.2.1. Příprava a kultivace

Primární buněčné kultury byly založeny u obou druhů z končetinových pupenů pulců stádia NF 55 (± 1). K jejich kultivaci při 29,5°C v 5,5% atmosféře CO₂ bylo použito médium o následujícím složení:

L-15 Leibovitz (Sigma-Aldrich)	33,3%
RPMI 1640 HEPES mod. (Sigma-Aldrich)	33,3%
FBS (Life Technologies)	10,0%
L-glutamin (Sigma-Aldrich)	2 mM
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	1,33 mg/ml
gentamycin (Sigma-Aldrich)	50 µg/ml
pyruvát sodný (1 mM)(Sigma-Aldrich)	1 mM
deionizovaná H ₂ O	46,5%

První pasáž byla provedena po 12 dnech směsí 0,25% trypsin-0,1% EDTA (0,5-krát konc.)(Sigma-Aldrich). K dalšímu pasážování byl již standardně používán 0,5% trypsin-0,2% EDTA (1-krát konc.)(Sigma-Aldrich). Získané buňky v kultuře nabyly epitelové morfologie.

4.3.2.2. Příprava buněčné suspenze

K připravené buněčné kultuře s konfluencí 80 – 90 % byl přidán roztok kolchicinu ve 2/3 PBS o koncentraci 0,2 mg/ml pro zastavení buněk v metafázi mitotického dělení. V kultivaci se pokračovalo dalších 4,5 h. Z kultivační lahve bylo poté odstraněno kultivační médium a byl přidán roztok 1-krát konc. trypsin-EDTA zředěný ve 2/3 PBS pro uvolnění adherentních

buněk ze dna kultivační láhve. Obvykle stačilo působit 7 minut. Trypsinizace buněk byla zastavena přidáním adekvátního množství FBS, tj. 1 ml FBS na 10 ml 1-krát konc. trypsin-EDTA. Buňky byly následně centrifugovány 5 min v polystyrenových zkumavkách při 900 RPM. Po odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v 10 ml 2/3 PBS a opět centrifugovány při použití stejných parametrů, supernatant byl důkladně odebrán. Pro nastavení vhodných hypotonizačních podmínek 38 mmol bylo k peletu přidáno 2 ml 100 mM KCl (+ 5 mM HEPES + 1 mM EGTA, pH = 7,3), buňky byly resuspendovány a následně bylo opatrně (po stěně zkumavky) přidáno 3,26 ml destilované vody. Po převrácení zkumavky byly buňky inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 min. Pokračovalo se fixací buněk, v prvním kroku přidáním 1,052 ml (tj. 1/6 objemu) fixativa, tedy směsi kyseliny octové a methanolu v poměru 1:3 (V/V). Následovala 15 min inkubace při pokojové teplotě. Buňky byly dále centrifugovány 5 min při 900 RPM, supernatant odebrán, bylo doplněno 5 ml čerstvé fixáže, pelet resuspendován probubláváním Pasteurovou pipetou a následovala inkubace 10 min při pokojové teplotě. Tento krok fixace se opakoval ještě dvakrát. Poslední přidáný objem fixáže byl adekvátní množství pro přípravu preparátů, tj. 0,5 – 2 ml. Buněčné suspenze byly pro další použití skladovány při 4°C, před každou přípravou preparátů byly vyměněna 1/2 objemu fixáže za čerstvou.

4.3.2.3. Příprava preparátů metafázních figur

Skla byla před nakápnutím suspenze patřičně odmaštěna a ošetřena následujícím způsobem. Po dobu 2 minut byla ponořena v kyvetě s xylenem, další dvě minuty v kyvetě s benzímem. Stříčkou s destilovanou vodou opláchnutá skla byla ponechána k oschnutí na vzduchu při pokojové teplotě. Poté byla na 2 min ponořena do čerstvé fixáže (směsi kyseliny octové a methanolu, 1:3 (V/V)), opět omyta destilovanou vodou a ponechána k oschnutí na vzduchu při pokojové teplotě. Preparáty pak byly připraveny metodou nakápnutí dle DuPasquiera. Na sklo vyhráté na 37°C byla z výšky zhruba 40 cm nakápnuta buněčná suspenze, v dalším kroku bylo před vyschnutím sklo během 2 s inkubováno v roztoku 50% kyseliny octové pro snížení odplavení pozorovaných metafázních figur a ponecháno k doschnutí na vzduchu při pokojové teplotě.

4.3.2.4. Izolace DNA z tkáně pomocí komerčního kitu

DNA byla izolována z jaterní tkáně pomocí DNA izolačního komerčního kitu Nucleo-spin Tissue kit (Macherey-Nagel) podle protokolu výrobce.

http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNATissue.pdf

4.3.2.5. Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou

DNA z jaterní tkáně v adekvátním množství pro velikost zkumavky byla nejprve homogenizována s 1 ml TNES pufru a proteinázou K (3-6 mg / 250 mg tkáně). Směs byla ponechána po promíchání cca 24 h v termobloku při 50°C s občasným promícháním. Následně byla přidána směs fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 25:24:1 (V/V) a to v přibližně stejném množství, tj. cca 1 ml. Směs byla ponechána k působení 10 min za neustálého promíchávání v horizontální poloze a poté 20 min centrifugována při 13 000 RPM a teplotě 8°C. Po odstranění horní vrstvy bylo přidáno 200 µl elučního pufru (GeneJet extraction kit, Fermentas), tzn. 10 mM Tris-HCl, pH=8,5, následovala inkubace za neustálého míchání v horizontální poloze po dobu 10 min a opět centrifugace 20 min při 13 000 RPM a 8°C. Horní vrstva byla opět odsáta a přidána k prvnímu. Spojené směsi horních vrstev byly smíchány se směsí chloroformu a isoamylalkoholu (24:1 (V/V)) v poměru 1:1 (V/V). Po 10-minutovém promíchávání v horizontální poloze byla směs dále centrifugována 25 min při 13 000 RPM a 8°C. Horní vrstva byla přenesena do mikrozkuavky a následně k ní bylo přidáno 50 µl 0,1-krát konc. 3M roztok octanu sodného a 2,5-násobek celkového objemu 96% vymraženého ethanolu. Směs byla po promíchání ponechána 1 h v -70°C a následujících 24 h v -20°C. Potom byla směs 20 min centrifugována při 14 500 RPM při 8°C, ethanolový supernatant byl opatrně odstraněn. Dále bylo přidáno 250 µl vymraženého 70% ethanolu a proběhla centrifugace při 14 500 RPM a teplotě 8°C. Supernatant byl odstraněn a krok se opakoval ještě jednou. Supernatant byl nakonec odstraněn a pelet DNA byl ponechán k vyschnutí v termobloku při 37°C na 10-20 min. Následně byl pelet resuspendován (v adekvátním množství pro mikrozkuavku) TE pufru a směs silně promíchána a inkubována 20 min při pokojové teplotě. DNA byla proměřena Nanodropem při 260 nm a skladována při -20°C.

V případě ošetření DNA izolované fenol-chloroformovou metodou byla DNA v mikrozkuavce po dobu 1 h inkubována v termobloku při 50°C s RNázou I (ThermoFisher), 5 µl na 50 µl izolované DNA o koncentraci 1430 ng/µl.

4.4. Příprava sond

4.4.1. Identifikace

Připravené buněčné suspenze byly odeslány na spolupracující pracoviště Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. v Brně, kde byly nakapány na skla potažená polyethylen-naftalenovou membránou umožňující mikrodisekční manipulace (P.A.L.M. GmbH), ponechány k zaschnutí a obarveny 3% roztokem Giemsa-Romanowski v 1x PBS (kapitola 4.5). Poloha metafázních figur byla zaznamenána fotograficky při zvětšení 1000-krát. Na základě analýzy získaných fotografií byly měření pomocí softwaru ACC Image Analyzer chromozómy rozříděny podle celkové relativní délky a poměru p/q ramen dle aktuální nomenklatury *Xenopus tropicalis* (Tymowska, 1973) a *Xenopus epitropicalis* (Tymowska a Fischberg, 1982).

4.4.2. Mikrodisekce

Na spolupracujícím pracovišti Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. v Brně byly dr. Svatavou Kubíčkovou podle identifikovaných metafázních figur jednotlivé chromozómy laserově mikrodisektovány a rozříděny laserovým pulzem do mikrozkuhavek s 4 µl PCR oleje pomocí PALM MicroLaser system (P.A.L.M. GmbH) napojeného na invertovaný mikroskop (Olympus) při použití imerzního oleje a zvětšení 1000-krát (Kubickova *et al.*, 2002). Počty získaných chromozómů činily 10-30 ks na jeden identifikovaný chromozóm.

4.4.3. Primární amplifikace (WGA₄)

Proces primární amplifikace izolovaných chromozómů byl proveden podle protokolu výrobce komerčního kitu GenomePlex Whole Genome Amplification kit WGA₄ (Sigma-Aldrich).

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/single-cell-whole-genome-amplification-kit.html>

4.4.4. Sekundární amplifikace (WGA₃)

K sekundární amplifikaci byl využit komerční kit GenomePlex Whole Genome Amplification Reamplification kit WGA₃ (Sigma-Aldrich). Jako značka byl inkorporován

Dig-11-UTP (Roche), v poměru vůči dTTP 1:4,9 (m/m). Pro každou sondu tak byla připravena následující PCR reakce:

57,0 µl	H ₂ O
7,5 µl	10-krát Amplification Master Mix
1,5 µl	dNTP Mix*
2,0 µl	Dig-11-UTP (11 mM)
1,0 µl	primární amplifikát (20 ng/µl)
5,0 µl	DNA Polymeráza
74,0 µl	celkem

*Z kitu nebyl použit originální dNTP mix, ale mix s následujícími koncentracemi nukleotidů: 10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP a 6,5 mM dTTP.

PCR reakce proběhla podle následujícího schématu:

cyklus	teplota	čas
1	95°C	3 min
2 – 15	94°C	15 s
	65°C	5 min
16	4°C	-

Koncentrace amplifikátů byla změřena Nanodropem při 260 nm a podrobena elektroforetické analýze (kapitola 4.4.7).

Amplifikáty byly přečištěny na kolonkách Gel extraction kitu (Fermentas) podle protokolu výrobce.

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf

4.4.5. Ethanolová precipitace DNA

Ke vzorku DNA byl přidán 2,5-násobek objemu vymraženého 96% ethanolu a 0,1-násobek 3M octanu sodného. Po lehkém promíchání byl vzorek umístěn na 60 min do -70°C a poté přes noc do -20°C. Následně byl vzorek centrifugován 30 min při 14 500 RPM a supernatant odstraněn. Ke vzorku bylo přidáno 250 µl 70% vymraženého ethanolu a následovala další centrifugace 10 min při 14 500 RPM. Proces odstranění supernatantu a centrifugace byl opakován a na závěr byl vzorek ponechán otevřený k doschnutí v termobloku při 37°C na 10 min. Na závěr byl přidán vhodný objem pro cílenou koncentraci produktu, která byla kontrolována na Nanodropu při 260 nm.

4.4.6. Příprava kompetitorové DNA

4.4.6.1. Autoklávováním

Kompetitorová DNA pro fluorescenční *in situ* hybridizaci byla připravena autoklávováním celogenomové DNA izolované z orgánů nebo tkání *X. tropicalis* při 121 °C po dobu 23 minut při tlaku 101,5 kPa v autoklávu.

4.4.6.2. Příprava *X. tropicalis* Cot-1 DNA

Alikvót izolované DNA v 1,5-mililitrové mikrozkuhavce (standardně 20 µl) byl naštěpen autoklávováním (viz předchozí odstavec), poté 5 min denaturován při 94°C v termostatu, odstaven na led a další 4 min při 65°C ekvilibrován. K jeho reasociaci byl použit 3M roztok NaCl tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,3M. Reasociační doba byla spočítána podle této rovnice:

$$\text{reasociační doba (s)} = \frac{1}{c \div 330}$$

c = koncentrace DNA (µg/ml); 330 (g/mol) = průměrná molární hmotnost 1 nukleotidu

Po odstavení na led byla přidána destilovaná voda, 5-krát konc. reakční pufr S1 nukleázy (Thermofisher), nukleáza (Thermofisher) (viz jednotlivá množství v následující tabulce, hodnoty pro pufr a nukleázu jsou vztaženy na 1 µg použité DNA) a mikrozkuhavka byla lehce promíchána.

DNA	1 µg
5-krát konc. reakční pufr S1 nukleázy	6 µl
S1 nukleáza	0,1 µl (tj. 10 u)
destilovaná voda	doplnit do 30 µl
celkem	30 µl

Následná inkubace probíhala 1 h při 37°C v termobloku. Činnost nukleázy byla zastavena 10-minutovým působením 1 µl 0,5M EDTA. Připravená cot-1 DNA byla umístěna na led a její koncentrace stanovena na Nanodropu při 260 nm.

4.4.7. Elektroforéza (ELFO)

Pro analýzu DNA a produktů PCR reakcí byla použita gelová elektroforetická metoda v prostředí 2% agarózy. 1 g agarózy byl rozpuštěn v 50 ml 1-krát konc. TBE pufru, následně ochlazená na cca 50°C a poté bylo do roztoku přidáno 50 µl ethidium bromidu o koncentraci 1 mg/ml. Roztok byl převeden do formy a po zasazení hřebenu ponechán ke ztuhnutí. Zhruba po 40 min byl hřeben vysazen, ztuhlý gel vložen do elektroforetické nádoby a zalit nadbytkem 1-krát konc. TBE pufru. Jednotlivé vzorky s množstvím alespoň 0,15 µg určené k analýze byly smíchány s 6-krát DNA Loading dye (Fermentas) v poměru 1:1 (V/V) a nanесeny na gel. Pro rozlišení velikosti fragmentů DNA (bp) byl samostatně nanесen stejný objem Gene Ruler 100 bp (Fermentas), resp. Gene Ruler 1kbp (Fermentas). Elektroforetická nádoba byla následně zapojena do elektrického obvodu se stejnosměrným proudem po dobu 5 min na 90 V a poté bylo napětí zvýšeno na 120 V až do zastavení analýzy. Výsledný gel s jednotlivými pruhy byl fotograficky zaznamenán černobílou kamerou na UV transluminátoru při 254 nm a zpracován softwarem IC Capture.

4.5. Chromozomální barvení roztokem Giemsa-Romanowski

Preparát s metafázními figurami byl vložen na 10 min do kyvety s 5% roztokem Giemsa-Romanowski s destilovanou vodou, opláchnut proudem destilované vody a ponechán k oschnutí na vzduchu při pokojové teplotě.

4.6. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

4.6.1. Paint-FISH

Připravené preparáty *Xenopus tropicalis* (kapitola 4.3.2.3) byly denaturovány roztokem 70% formamidu ve 2x SSC (pH = 7,0) po dobu 2 min při 72°C, kyvety s vytemperovaným roztokem byly umístěny ve vodní lázni. Ihned potom byly preparáty dehydratovány methanolvou řadou, tj. v kyvetách se 70%, 90% a 100% methylalkoholem po dobu 3 min za neustálého třepání. Nakonec byly ponechány k uschnutí na vzduchu. Na suchá skla zahřátá na 37°C (položená na plotýnce) bylo pak aplikováno 22 µl hybridizační směsi připravené dle následujícího postupu:

14,0 µl	Master Mix (79% formamid, 3,14-krát konc. SSC, 160 µg/µl dextran sulfát)
5,0 µl	<i>X. tropicalis</i> DNA kompetitor (1 µg/µl)
2,0 µl	sonda WGA ₃ (500 ng/µl)
1,0 µl	H ₂ O
22,0 µl	celkem

Hybridizační směs byla nejprve 10 min denaturována při 72°C v cykleru, poté prudce zchlazena na ledu po dobu 3 min a následně v cykleru opět renaturována 90 min při 37°C. Aplikovaná směs byla přikryta krycím sklem (22x22 mm) a dále inkubována přes noc při 37°C ve vlhké komůrce s parami roztoku 50% formamidu ve 2x SSC. Následující den byly preparáty vyjmuty z vlhké komůrky a podrobeny stringečnímu mytí ve vytemperovaném roztoku 50% formamidu ve 2x SSC při 42°C po dobu dvakrát 5 min. V průběhu byla uvolněna krycí skla. Preparáty byly následně promyty třikrát 5 min v Petriho misce s 2x SSC umístěné na třepačce a 5 min v Petriho misce s 1x TNT. Hned poté byl na sklo aplikován 1 ml TNB, pokračovalo se inkubací při pokojové teplotě v temné komůrce s H₂O. Po uplynutí 30 min byl roztok TNB slit a na sklo byla nanášena zcentrifugovaná směs protilátky s pufrem, tj. 5 µl α-Dig-Rhodamin (200 µg/ml) s 995 µl TNB, 60-minutová inkubace při pokojové teplotě probíhala opět v temné komůrce s H₂O. Potom byla protilátka třikrát spláchnuta lehkým proudem 1x TNT a dále třikrát promyta po dobu 5 min v Petriho misce s 1x TNT umístěné na třepačce. Následně bylo aplikováno 10 µl „montovacího“ média s DAPI Antifade ES (0,125 µg/µl)(Cytocell), převrstveno krycím sklem (50x24 mm) a izolováno lakem. Po 20-minutové inkubaci ve tmě při 4°C bylo možné preparáty pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem, popř. uchovávat při 4°C v temném prostředí.

4.6.2. Zoo-FISH

Připravené preparáty *Xenopus mellotropicalis* (kapitola 4.3.2.3) byly denaturovány roztokem 70% formamidu ve 2x SSC (pH = 7,0) po dobu 2 min při 72°C, kyvety s vytemperovaným roztokem byly umístěny ve vodní lázni. Ihned potom byly preparáty dehydratovány methanolovou řadou, tj. v kyvetách se 70%, 90% a 100% methylalkoholem po dobu 3 min za neustálého třepání. Nakonec byly ponechány k uschnutí na vzduchu. Na suchá skla zahřátá na 37°C (položená na plotýnce) bylo pak aplikováno 22 µl hybridizační směsi připravené dle následujícího postupu:

14,0 µl	Master Mix (79% formamid, 3,14-krát konc. SSC, 160 µg/µl dextran sulfát)
5,0 µl	<i>X. tropicalis</i> DNA kompetitor (1 µg/µl)
3,0 µl	sonda WGA ₃ (500 ng/µl)
22,0 µl	celkem

Hybridizační směs byla nejprve 10 min denaturována při 72°C v cykleru, poté prudce zchlazena na ledu po dobu 3 min a následně v cykleru opět renaturována 120 min při 37°C. Aplikovaná směs byla lehce převrstvena krycím sklem (22x22 mm) a dále inkubována tři dny při 37°C ve vlhké komůrce s roztokem 50% formamidu ve 2x SSC. Poté byly preparáty vyjmuty z vlhké komůrky a podrobeny stringenčnímu mytí ve vytemperovaném roztoku 50% formamidu ve 2x SSC při 38°C po dobu dvakrát 5 min. V průběhu byla uvolněna krycí skla. Následně byly promyty třikrát 5 min v Petriho misce s 2x SSC umístěné na třepačce a 5 min v Petriho misce s 1x TNT. Hned poté byl na sklo aplikován 1 ml TNB, pokračovalo se inkubací při pokojové teplotě v temné komůrce s H₂O. Po uplynutí 30 min byl roztok TNB slit a na sklo byla nanесena zcentrifugovaná směs protilátky s pufrem, tj. 5 µl α-Dig-Rhodamin (200 µg/ml) s 995 µl TNB, 60-minutová inkubace při pokojové teplotě probíhala opět v temné komůrce s H₂O. Potom byla protilátka třikrát spláchnuta lehkým proudem 1x TNT a dále třikrát promyta po dobu 5 min v Petriho misce s 1x TNT umístěné na třepačce. Následně bylo aplikováno 10 µl „montovacího“ média s DAPI Antifade ES (0,125 µg/µl)(Cytocell), převrstveno krycím sklem (50x24 mm) a izolováno lakem. Po 20-minutové inkubaci ve tmě při 4°C bylo možné preparáty pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem, popř. uchovávat při 4°C v temném prostředí.

5. Výsledky

Analýza morfometrických dat užitých k identifikaci chromozómů založená na celkové relativní délce chromozómu a poměru krátkých a dlouhých ramen pomocí softwaru ACC Image Analyzer odhalila odchylku od očekávaného karyotypu *X. epitropicalis*, Tymowska a Fischberg 1982. Statistika z měření 33 metafázních figur (Tabulka 1) ukazuje zjevnou nesrovnalost u chromozómu 2b, jeho velikost se lišila o +0,39% tetraploidního setu a v poměru p-/q- ramen o +0,13. Vyloučena byla translokace v průběhu kultivace kmenových buněk pomocí karyotypové kontroly vybraných kultur. Druhou později potvrzenou možností bylo užití jiného druhu od samého počátku. Ten byl identifikován jako *Xenopus new tetraploid 1*, posléze popsán jako *Xenopus mellotropicalis*, Evans 2015.

Tabulka 1: Morfometrická analýza založená na průměru naměřených hodnot 33 metafázních figur *X. mellotropicalis* ve srovnání s hodnotami *X. epitropicalis* – výraznou odchylku pozorujeme u chromozómu 2b.

označení chromozómu	<i>X. epitropicalis</i>		<i>X. mellotropicalis</i>	
	relativní délka (% 4n sady)	poměr ramen (p-/q-)	relativní délka (% 4n sady)	poměr ramen (p-/q-)
1a	3,87	0,71	3,80	0,70
1b	3,53	0,70	3,65	0,67
2a	3,21	0,67	3,17	0,62
2b	3,07	0,68	3,46	0,81
3a	2,75	0,21	2,82	0,20
3b	2,66	0,18	2,64	0,20
4a	2,90	0,64	2,94	0,60
4b	2,77	0,67	2,74	0,62
5a	2,70	0,49	2,76	0,42
5b	2,57	0,44	2,57	0,41
6a	2,59	0,89	2,70	0,88
6b	2,31	0,88	2,59	0,88
7a	2,50	0,72	2,42	0,66
7b	2,41	0,78	2,26	0,79
8a	2,47	0,28	2,41	0,21
8b	2,38	0,23	2,22	0,21
9a	1,69	0,80	1,44	0,80
9b	1,54	0,80	1,54	0,81
10a	1,06	0,76	1,04	0,70
10b	1,02	0,75	0,95	0,72

V rámci optimalizace metodiky paint-FISH a Zoo-FISH byla nejprve testována verze protokolu bez přítomnosti kompetitorové DNA, jež je v obdobných metodických postupech často užívána pro odstínění nespecifických signálů z vysoce repetitivních chromozomálních oblastí telomer a pericentrických oblastí, kam nasedají velmi krátké malovací sondy. Výsledky byly nevyhovující, nespecifický signál „pozadí“ se svou intenzitou vyrovnal síle detekovaného chromozómu (bez obrazové dokumentace).

Komerčně dostupný kompetitor, dříve běžně používaný v laboratoři, již nebyl k dispozici. Bylo proto přistoupeno k testování protokolu pro přípravu cot-1 DNA a autoklávované celogenomové DNA izolované z *X. tropicalis* pro FISH.

Původní protokol přípravy cot-1 byl v průběhu testování na základě literatury upraven (Zou a Li, 2012), inkubační doba a teplota byla z 15 min při 23°C změněna na 1 h při 37°C. Na jednu úspěšnou hybridizaci paint-FISH bylo zapotřebí až 6000 ng cot-1, při použití autoklávované DNA bylo třeba pouze 1000 ng, tzn. šestinásobný rozdíl.

Pro kompetitorovou Zoo-FISH DNA byly navíc otestovány dvě metody izolace, DNA izolačním komerčním kitem Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel) a fenol-chloroformovou metodou. Druhá jmenovaná technika způsobu izolace DNA byla testována z důvodu větší výtěžnosti získané DNA. Izolace pomocí DNA izolačního komerčního kitu kolonkovou metodou přinášela výtěžnost nanejvýš 2,5 mg DNA z 1,3 g žabí jaterní tkáně čtyř žab, tj. 19%. Oproti tomu izolace fenol-chloroformovou metodou měla výtěžek alespoň 3,5 mg DNA z 1 g žabí jaterní tkáně, tj. přes 35%.

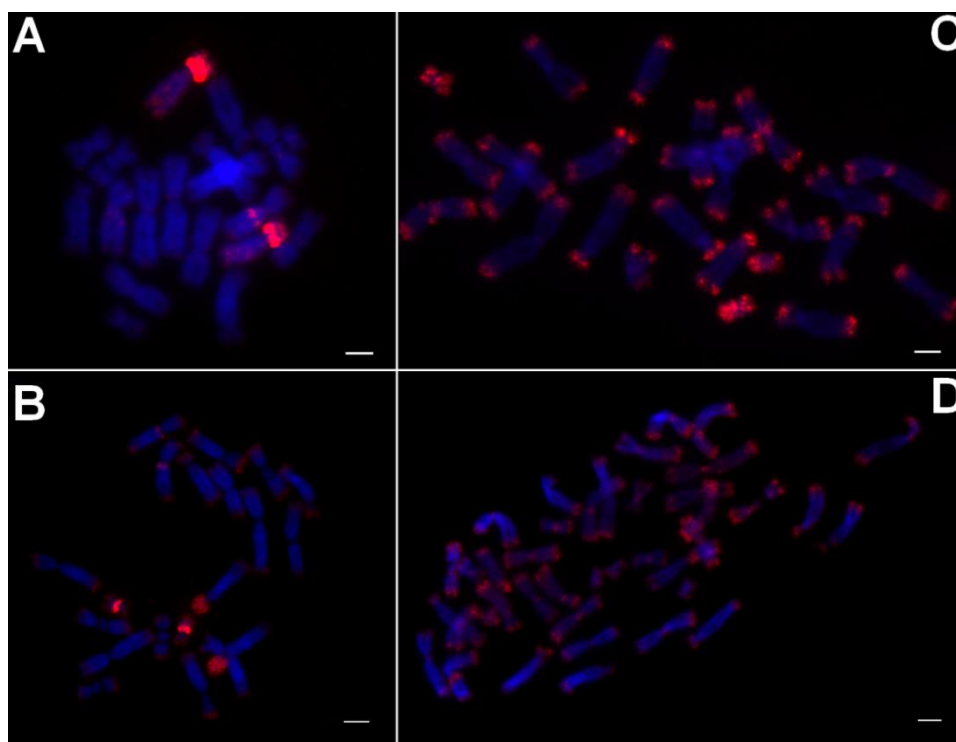
Pro neuspokojivé hybridizační výsledky využívající DNA izolovanou použitím fenol-chloroformové metody izolace bylo testováno ošetření získané DNA RNázou I (ThermoFisher) v různých variantách následného naložení s ošetřenou DNA, a to: přečištěním přes kolonku z DNA izolačního komerčního kitu Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel), 10-minutovým působením 1 µl 0,5M EDTA při 65°C, autoklávováním. Výsledky všech tří hybridizací s využitím odlišně ošetřené izolované DNA však nevykazovaly žádné patrné zlepšení oproti DNA neošetřené RNázou I.

Testování probíhalo podle stejného postupu jako v kapitole 4.6, měnila se pouze vybraná kompetitorová DNA a její způsob izolace. K testu byly využity sondy, u kterých již bylo v předchozích hybridizacích dosaženo uspokojivého výsledku při použití autoklávované kompetitorové DNA izolované pomocí DNA izolačního komerčního kitu.

Přehled optimalizačních výsledků shrnuje Tabulka 2 a Obrázek 7.

Způsob izolace DNA	Typ přípravy	Výsledek
komerčním kitem	autoklávem	Část A
	cot-1 protokolem	Část B
fenol-chloroformovou metodou	autoklávem	Část C
	cot-1 protokolem	Část D

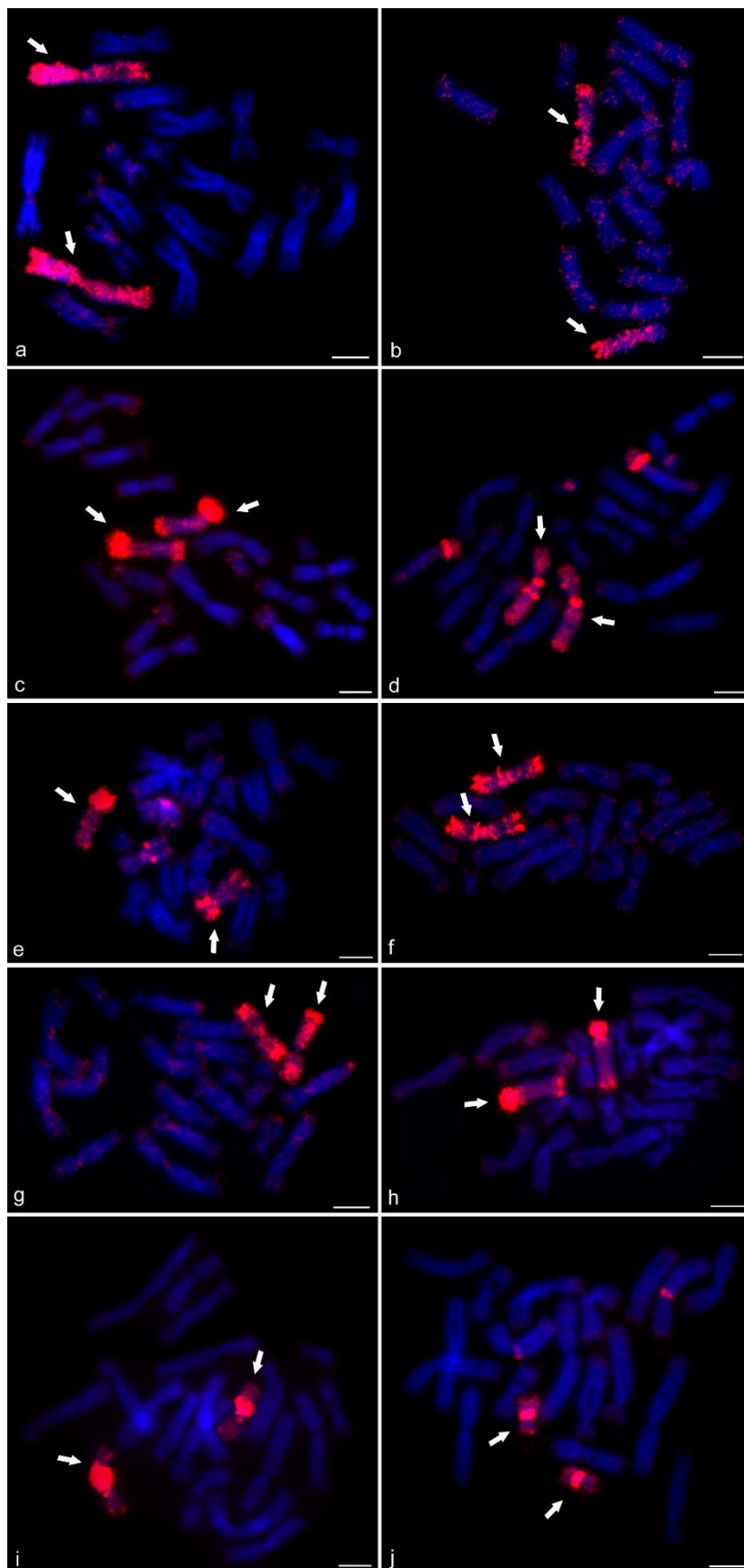
Tabulka 2: Shrnutí výsledků optimalizačních scénářů paint-FISH a Zoo-FISH s odkazem na výslednou část obrázku 7.



Obrázek 7: Shrnutí výsledků optimalizačních FISH: **A** – DNA izolační komerční kit s autoklávovanou DNA (paint-FISH XTR 5), **B** – DNA izolační komerční kit s cot-1 (paint-FISH XTR 10), **C** – izolace fenol-chloroformovou metodou s autoklávovanou DNA (Zoo-FISH XTR 10), **D** – izolace fenol-chloroformovou metodou s cot-1 (Zoo-FISH XTR 7)

Na základě srovnání kvality získaných snímků výsledných FISH byla pro zbytek hybridizací zvolena varianta přípravy kompetitorové DNA autoklávováním a izolace DNA izolačním komerčním kitem.

Po úspěšné optimalizaci se použitím metody fluorescenční *in situ* hybridizace paint-FISH podařilo hybridizovat 10 malovacích sond připravených z mikrodisektovaných chromozómů podle GenomePlex WGA₄ Amplification a WGA₃ Reamplification kit protokolu na preparáty karyotypu *X. tropicalis* (Obrázek 8). Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo možné aplikací každé sondy zvlášť detekovat dohromady 10 homologních párů chromozómů nesoucích nejjasnější signál v kompletních metafázních figurách. Silnější signály mimo vybrané homologní chromozómy pozorujeme u p-ramen sondy XTR 5 (e) či pericentrických signálů u XTR 4 (d) a 10 (j). Touto metodikou byla zároveň ověřena správná identifikace chromozómů. V případě nesprávné identifikace a záměny některých chromozómů před mikrodisekcí by totiž nebylo možné pozorovat pouze dva chromozómy, ale detekovaný signál by byl patrný i na dalších z nich.

**Obrázek 8:**

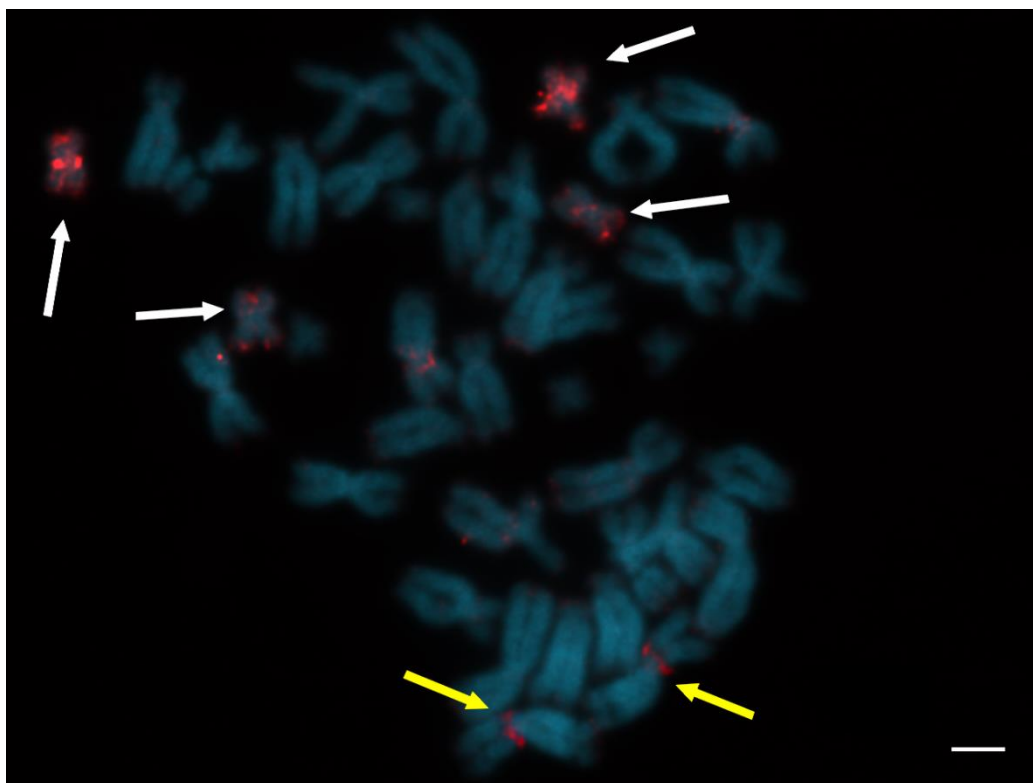
Výsledné snímky aplikace fluorescenčních malovacích sond *X. tropicalis* (XTR) na karyotyp *X. tropicalis* (metoda paint-FISH) při zvětšení 1000x

Bílé šipky názorně poukazují na označený pár homologických chromozómů sondou připravenou z chromozómu XTR 1 (a), XTR 2 (b), XTR 3 (c), XTR 4 (d), XTR 5 (e), XTR 6 (f), XTR 7 (g), XTR 8 (h), XTR 9 (i), XTR 10 (j).

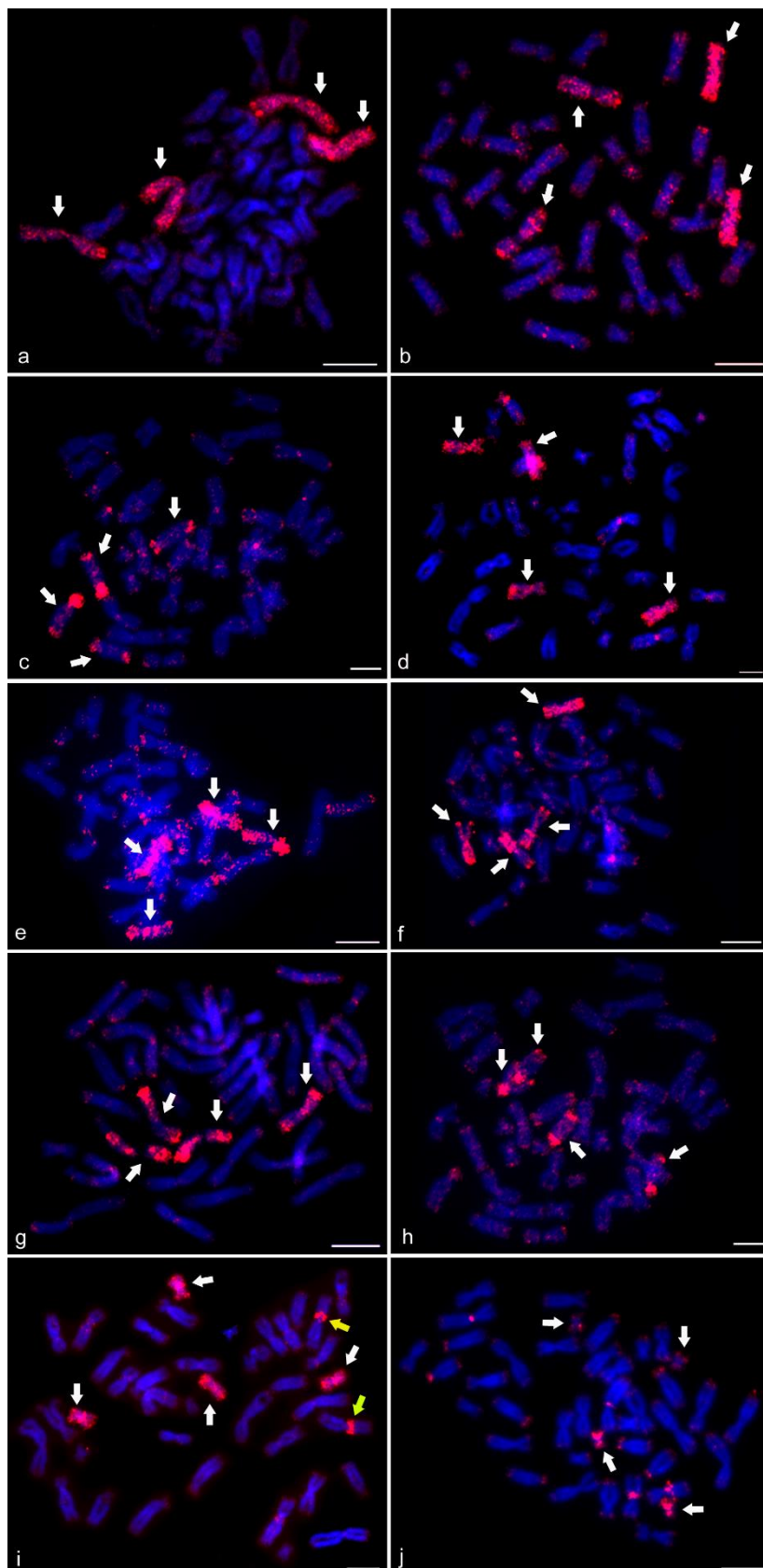
Vedle červeně označených homologů pozorujeme slabé signály na telomerách či v blízkosti centromer způsobené výskytem vysoce repetitivních sekvencí, patrné zejména u XTR 4 (d), XTR 5 (e) a XTR 10 (j).

Měřítka v pravém dolním rohu zastupují 10 μm .

Pomocí mezidruhové fluorescenční *in situ* hybridizace Zoo-FISH za použití totožných sond *X. tropicalis* aplikovaných na preparáty *X. mellotropicalis* se úspěšně podařilo vizualizovat kvartety, tedy skupinu homeologních chromozómů. Mezi dvojicí paralogů „a“ a „b“ pozorujeme rozdílnou intenzitu získaných signálů (Obrázek 10). V části (i) sonda XTR 9 detekuje nerekiprokou translokaci mezi chromozómy XME 2 a XME 9. Signál tzv. navíc je patrný pouze na dvojici chromozómů XME 2b, v detailnějším pohledu na Obrázku 9. Malovací sonda XTR 9 hybridizovala na páry chromozómů XME 9a a XME 9b a současně také na část krátkého ramene chromozómu XME 2b, ale nikoliv na XME 2a. Zjištění bylo potvrzeno hybridizací malovací sondy XTR 2 na dvojice chromozómů XME 2a a XME 2b, kdy odpovídající část peramena chromozómu XME 2a zůstala neoznačena (b).



Obrázek 9: Výsledná Zoo-FISH hybridizace sondy XTR 9 detekující dva páry chromozómů XME 9a a XME 9b (bílé šipky) a současně translokaci do pericentrické oblasti chromozómů XME 2b (žluté šipky), měřítko v pravém dolním rohu zastupuje 10 μm .

**Obrázek 10:**

Výsledné snímky aplikace fluorescenčních sond *X. tropicalis* (XTR) na karyotyp *X. mellotropicalis* (XME)(metoda Zoo-FISH) při zvětšení 1000x

Bílé šipky názorně poukazují na sondou označený kvartet chromozómů, obrázky jsou seřazeny dle následujícího pořadí (sonda z chromozómu XTR č. X – označuje dvojice chromozómů XME Xa a Xb): XTR 1 – XME 1a a 1b (a), XTR 2 – XME 2a a 2b (b), XTR 3 – XME 3a a 3b (c), XTR 4 – XME 4a a 4b (d), XTR 5 – XME 5a a 5b (e), XTR 6 – XME 6a a 6b (f), XTR 7 – XME 7a a 7b (g), XTR 8 – XME 8a a 8b (h), XTR 9 – XME 9a a 9b (i), XTR 10 – XME 10a a 10b (j).

Žluté šipky v části (i) poukazují na dvojici chromozómů XME 2b, kdy sonda XTR 9 detekuje rozsáhlou nreciproickou translokaci mezi chromozómy 2 a 9.

Především v pericentrických a telomerických oblastech pozorujeme slabší nespecifické signály přisuzované repetitivním sekvencím.

Měřítka v pravém dolním rohu zastupují 10 μ m.

6. Diskuze

6.1. Optimalizace metod paint-FISH a Zoo-FISH

Jako důležitý prvek pro optimalizaci výsledků FISH experimentů aplikovaných na karyotyp se ukazuje volba kompetitorové DNA blokující nespecifické signály, zvyšuje tak ostrost a sílu specifických signálů. Nejjednodušší první volbou může být komerčně dostupný kompetitor (Krylov *et al.*, 2010). U komerčně připravených kompetitorů se jedná o frakci cot-1 DNA bohatou na repetitivně sekvence, jejíž rozsah je uváděn ve většině případů mezi 50 a 300 bp. Na trhu jsou k dostání komerční produkty jako např. Hybloc™ dostupný v tuto chvíli pro myši, krysy, lidský, bovinní, ovčí, vepřové, kuřecí a lidské FISH či Cot-1 DNA® Blocking Reagent. U produktů je uváděno, že vystačí na 500 hybridizací. Všeobecně je komerční příprava kompetitorové DNA nyní zaměřená především na experimenty pro myši a lidské FISH metody (Appliedgenetics.com, 2016, Thermofisher.com, 2016a). Mezi další možnosti patří využití „nalámané“ DNA z lososího spermatu (sheared salmon sperm DNA), která je často univerzální volbou (Krylov *et al.*, 2003, Uno *et al.*, 2013, Piperidis, 2014, Li *et al.*, 2016) (Thermofisher, 2016b), či sonikovaná DNA ze sledího spermatu (Pinkel *et al.*, 1986), cot-1 DNA (de Oliveira *et al.*, 2005), popř. sonikovaná celogenomová DNA (Uno *et al.*, 2015) nebo autoklávovaná celogenomová DNA (Bi *et al.*, 2009). Udávaná koncentrace neznačené kompetitorové DNA pro různé druhy FISH bývá doporučována na 5-50krát vyšší, než je užitá koncentrace značených sond (Cremer *et al.*, 2008), často záleží na empirických a ekonomických podmínkách pro výběr vhodné kompetitorové DNA. Naše výsledky demonstrují, že optimálním kandidátem ekonomicky přístupné takové DNA pro FISH libovolného organismu by mohla být autoklávovaná celogenomová DNA, podobně jako v případě Bi *et al.*, 2009. Autoklávováním DNA je získána velká část fragmentů v rozmezí do 300 bp (Simmon *et al.*, 2004). Námi testovaný protokol cot-1 přinášel kvalitní výsledky (Obrázek 7B), nicméně výsledná spotřeba cca 6000 ng cot-1 na jednu hybridizaci a spotřeba S1 nukleázy (Thermofisher) při její přípravě byla směrodatná pro upuštění od jejího užití ve FISH.

Jedním ze zásadních faktorů úspěšnosti přípravy kompetitorové DNA a byl identifikován i způsob izolace DNA, z níž je připravována. Výsledky ukázaly, že způsob izolace DNA fenol-chloroformovou metodou je nevhodný pro tento postup (Obrázek 7C, 7D). Za příčinu neuspokojivých finálních hybridizací, kdy nespecifické signály byly velmi silné, byla v případě fenol-chloroformové metody izolace považována pozůstalá frakce RNA, která v průběhu FISH komplementárně vyvazovala kompetitorovou DNA a tím zvyšovala nespecifické signály. Ta

byla odstraněna působením RNázy I (Yakovlev *et al.*, 1995). Přesto nedošlo ke zlepšení výsledků.

Dále je dobré podotknout, že pro efektivní analýzu rozsáhlejších karyotypů ($2n > 50$) by již bylo optimální přistoupit k softwarové analýze, např. Ikaros Karyotyping System (Metasystems.com, 2016), namísto manuálního měření jednotlivých chromozómů a dohledávání kompletních metafázních figur.

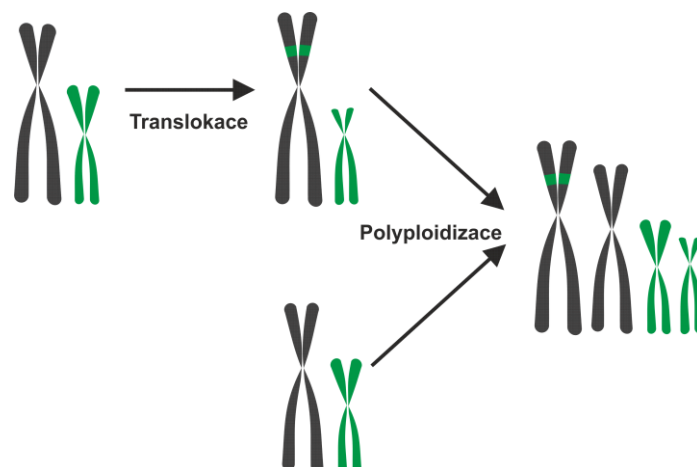
6.2. Chromozomální evoluce *Xenopus mellotropicalis*

Xenopus mellotropicalis, Evans *et al.*, 2015, byl na základě morfologické podobnosti karyotypů zařazen vedle *X. tropicalis*, Gray, 1864, a *X. epitropicalis*, Fischberg, Colombelli a Picard, 1982, do jednotné skupiny, později označené jako *Silurana* (Tymowska, 1991, Kobel *et al.*, 1996). Tento fakt stvrzuje morfometrická analýza kompletních metafázních figur *X. mellotropicalis* dle karyotypu *X. epitropicalis* (Tymowska a Fischberg, 1982), která, ač byla zpočátku chybně aplikovaná, nezabránila správné identifikaci jednotlivých chromozómů. Shodují se i celkové počty chromozómů a relativní velikost genomů v poměru k evoluční ploidii, $2n=40$. Výjimku tvoří diploidní *X. tropicalis* ($2n = 20$), jehož genom je zhruba poloviční (Tymowska, 1991). Vysokou morfologickou podobnost chromozomálních párů potvrzují i rozsáhlé experimenty s mezidruhovým křížením ústící ve formování multivalentů v průběhu meiózy (Muller, 1977). Poloha konstitutivního heterochromatinu *X. epitropicalis* vizualizovaného pomocí C-pruhovací techniky nicméně v porovnání s *X. tropicalis* vykazuje heterogenitu mezi chromozómovými páry v rámci jednoho kvartetu a tvoří tak dva různé vzorce (Tymowska a Fischberg, 1982). (Shodující se výsledky C-pruhování u *X. mellotropicalis* potvrzuje recentně odeslaný manuskript umístěný v přílohách.) Značná odlišnost je pak shledána v porovnání s C-pruhováním *X. laevis* (Schmid a Steinlein, 1991), což koreluje s rozlišením skupin *Silurana* a *Xenopus* do dvou podrodů, nejen na základě počtu chromozómů (Kobel *et al.*, 1996, Evans, 2008). Nedávná rozsáhlá komparativní studie druhů *Xenopus* založená na replikačním pruhování, v níž je zahrnut i *X. mellotropicalis*, však eviduje kompletní homologii a vysokou evoluční konzervovanost ve srovnání chromozomálních párů, resp. kvartetů všech tří druhů *Silurana*. Autoři v evolučních vztazích mezi nimi nevyklučují pouze malé chromozomální přestavby jako drobné telomerické reciproké translokace, inserce a inverze (Schmid a Steinlein, 2015).

Podobně jako v případě *X. laevis* (Krylov *et al.*, 2010) byl ke studiu chromozomální evoluce aplikován molekulárně cytogenetický metodický přístup FISH, a to značenými celochromozómovými malovacími sondami *X. tropicalis*, kterých se tentokrát podařilo připravit všech 10. Nefunkčnost sond XTR 2 a XTR 4 byla autory publikace Krylov *et al.* (2010) tehdy odůvodněna špatnou identifikací předcházející mikrodisekcím. Přípustná je ovšem i možnost, že roli hrála např. volba kompetitorové DNA (více v části Optimalizace FISH). V rámci aplikace mezidruhové Zoo-FISH bylo vizualizováno 10 kvartetů chromozómů, tzn. deset dvojic párů paralogních chromozómů. Tyto výsledky korelují s evoluční tetraploidií i velmi blízkou příbuzností obou druhů, jak již tvrdí zmíněné studie (Tymowska, 1991, Schmid a Steinlein, 2015).

Speciace střídáním bifurkačního a retikulačního scénáře v průběhu evoluce rodu *Xenopus* byla rozsáhle diskutována a jednoznačně potvrzena (Evans, 2008). U jednotlivých druhů se zvýšenou ploidií lze proto uvažovat o autopolyploidii či allopolyploidii, tzn. u všech vyjma *X. tropicalis* ($2n=20$). Dosavadní studie podporují rozšířený fenomén allopolyploidie u všech polyploidních zástupců drápatek podrodu *Xenopus*, v případě podrodu *Silurana* ovšem situace nebyla tak jasná (Evans, 2008, Evans *et al.*, 2015, Schmid *et al.*, 2015a). Výsledky C-pruhování vypovídaly ve prospěch allotetraploidie (Tymowska a Fischberg, 1982, Tymowska, 1991), zatímco na základě replikačního pruhování (Schmid a Steinlein, 2015, Schmid *et al.*, 2015a) byla přípustná i autotetraploidie.

Nereciproká translokace chromozómu XME 9a na XME 2b, kterou se podařilo detekovat pomocí morfometrických a molekulárně cytogenetických technik touto studií, jednoznačně potvrzuje allotetraploidní scénář polyploidizace (Obrázek 11). K translokaci muselo nutně dojít již u diploidního předka, tzn. ještě před celogenomovou duplikací, neboť je detekovatelná pouze na dvou chromozómech v kompletních metafázních figurách.



Obrázek 11: Schématické znázornění shrnující translokační a polyploidizační události haploidní sady v chromozomální evoluci *Xenopus mellotropicalis* detekovanou pomocí Zoo-FISH. Nalevo černý chromozóm reprezentuje XME 2 a zelený chromozóm reprezentuje XME 9 u diploidního předka. Jako výsledek allopolyploidizační události, tj. křížení s blízkce příbuzným druhem – naznačeno drobnou odlišností ve velikosti chromozómů, sledujeme chromozómy XME 2 (a+b), z toho jeden s translokací, a dva chromozómy XME 9 (a+b).

Tyto výsledky vyvrací dosavadní předpoklady, kdy byla očekávána pouze jedna polyploidizační událost u podrodu *Silurana* (Evans *et al.*, 2015, Schmid *et al.*, 2015a). Navíc ukazují, že ke zkoumání chromozomální evoluce celých karyotypů v rámci blízkých druhů jsou komparativní pruhovací techniky nevhodné.

6.3. Další směřování

V návaznosti na tato zjištění považuji za vhodné přistoupit ke genetickému mapování a pokusit se s využitím srovnání již známé polohy genů *X. tropicalis* lokalizovat vybrané geny přítomné v translokované části, např. pomocí FISH-TSA. Rovněž by bylo zajímavé obdobným způsobem prostudovat karyotyp *X. epitropicalis* a to pomocí molekulárně cytogenetických přístupů a pruhovacích technik. Srovnání výsledků dvou takto podobných karyotypů by mohlo přinést cenné poznatky o evoluci karyotypů celého podrodu *Silurana*.

7. Závěr

1. Na základě morfometrické analýzy se podařilo úspěšně připravit z mikrodisektovaných chromozómů *X. tropicalis* deset celochromozómových malovacích sond.
2. Metodika FISH byla optimalizována pro použití dostupné kompetitorové DNA a zároveň byl otestován vhodný způsob izolace DNA pro FISH.
3. Aplikací připravených sond na preparáty *X. tropicalis* byly identifikovány jednotlivé chromozómové páry druhu *X. tropicalis* metodou paint-FISH.
4. Metodou Zoo-FISH byly na preparátech *X. mellotropicalis* detekovány chromozomální kvartety svědčící o polyploidizační události v průběhu evoluce tohoto druhu. Navíc byla detekována nereciproká translokace mezi chromozómy 9a a 2b.
5. Zmíněná translokace potvrzuje allotetraploidní původ *X. mellotropicalis* a vyvrací současně uznávanou hypotézu kalkulující pouze s jednou polyploidizační událostí v rámci evoluce polyploidních druhů skupiny *Silurana*.

Výsledky této diplomové práce jsou v době odevzdání součástí odeslané publikace k recenznímu řízení „The evidence for the origin of *Xenopus mellotropicalis* via independent polyploidization event revealed by Zoo-FISH“, kde jsou poznatky rozšířeny o výsledky cytogenetické analýzy sekvenčního pruhování (pomocí barvení Giemsou, fluorescenčně cytochromem C a C-pruhování) a 5S a 28S ribozomální DNA FISH. Publikace je k nalezení v přílohách.

Seznam literatury

* ... sekundární zdroj citací

- ACAR, H., KAYNAK, M., YAKUT, T., UCAR, F. a EGELI, U. 2002. Determination of allelic deletion of multiple endocrine neoplasm type 1 (MEN1) gene in acute myeloid leukemia (AML) by application of FISH-TSA technique. *Teratog Carcinog Mutagen*, 22, 369-75.
- AMORES, A., CATCHEN, J., NANDA, I., WARREN, W., WALTER, R., SCHARTL, M. a POSTLETHWAIT, J. H. 2014. A RAD-tag genetic map for the platyfish (*Xiphophorus maculatus*) reveals mechanisms of karyotype evolution among teleost fish. *Genetics*, 197, 625-641.
- BI, K., BOGART, J. P. a FU, J. 2009. An examination of intergenomic exchanges in A. laterale-dependent unisexual salamanders in the genus *Ambystoma*. *Cytogenetic and Genome Research*, 124, 44-50.
- BIAN, C., HU, Y., RAVI, V., KUZNETSOVA, I. S., SHEN, X., MU, X., SUN, Y., YOU, X., LI, J., LI, X., QIU, Y., TAY, B. H., THEVASAGAYAM, N. M., KOMISSAROV, A. S., TRIFONOV, V., KABILOV, M., TUPIKIN, A., LUO, J., LIU, Y., SONG, H., LIU, C., WANG, X., GU, D., YANG, Y., LI, W., POLGAR, G., FAN, G., ZENG, P., ZHANG, H., XIONG, Z., TANG, Z., PENG, C., RUAN, Z., YU, H., CHEN, J., FAN, M., HUANG, Y., WANG, M., ZHAO, X., HU, G., YANG, H., WANG, J., WANG, J., XU, X., SONG, L., XU, G., XU, P., XU, J., O'BRIEN, S. J., ORBAN, L., VENKATESH, B. a SHI, Q. 2016. The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts. *Sci Rep*, 6, 24501.
- BIRON-SHENTAL, T., FEJGIN, M. D., SIFAKIS, S., LIBERMAN, M., ANTSAKLIS, A. a AMIEL, A. 2012. Endoreduplication in cervical trophoblast cells from normal pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 25, 2625-8.
- *BISBEE, C. A., BAKER, M. A., WILSON, A. C., HAJI-AZIMI, I. a FISCHBERG, M. 1977. Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science*, 195, 785-7.
- BUGNO-PONIEWIERSKA, M., SLOTA, B., PAWLINA, K., POTOCKI, L., GURGUL, A., SLOTA, E. a KLUKOWSKA-ROTZLER, J. 2014. Gene mapping as a method for verifying sequence localization based on interspecific chromosome painting (Zoo-FISH). *Folia Biol (Krakow)*, 62, 17-21.
- CANESTRO, C., BASSHAM, S. a POSTLETHWAIT, J. 2005. Development of the central nervous system in the larvacean *Oikopleura dioica* and the evolution of the chordate brain. *Dev Biol*, 285, 298-315.
- COMAI, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet*, 6, 836-846.

- *CONLON, J. M. a MECHKARSKA, M. 2014. Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. *Pharmaceuticals*, 7, 58-77.
- CREMER, M., GRASSER, F., LANCTOT, C., MULLER, S., NEUSSER, M., ZINNER, R., SOLOVEI, I. a CREMER, T. 2008. Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods Mol Biol*, 463, 205-39.
- DA SILVA, L. L. L., DOS SANTOS, A. R., GIULIANO-CAETANO, L. a DIAS, A. L. 2016. Chromosomal characterization in two species of an *Astyanax bimaculatus* complex (Characidae, Characiformes) using different techniques of chromosome banding. *Cytotechnology*, 68, 1277-1286.
- DE OLIVEIRA, E. H. C., HABERMANN, F. A., LACERDA, O., SBALQUEIRO, I. J., WIENBERG, J. a MÜLLER, S. 2005. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*, 114, 338-343.
- DE SA, R. O. a HILLIS, D. M. 1990. Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol Biol Evol*, 7, 365-76.
- DEHAL, P. a BOORE, J. L. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol*, 3, e314.
- DROUIN, G. a DE SÁ, M. M. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 481-493.
- EIBEN, B., BARTELS, I., BÄHR-PORSCH, S., BORGMANN, S., GATZ, G., GELLERT, G., GOEBEL, R., HAMMANS, W., HENTEMANN, M., OSMERS, R., RAUSKOLB, R. a HANSMANN, I. 1990. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *American Journal of Human Genetics*, 47, 656-663.
- EVANS, B. J. 2008. Genome evolution and speciation genetics of clawed frogs (*Xenopus* and *Silurana*). *Front Biosci*, 13, 4687-706.
- EVANS, B. J., CARTER, T. F., GREENBAUM, E., GVOŽDÍK, V., KELLEY, D. B., MCLAUGHLIN, P. J., PAUWELS, O. S. G., PORTIK, D. M., STANLEY, E. L., TINSLEY, R. C., TOBIAS, M. L. a BLACKBURN, D. C. 2015. Genetics, morphology, advertisement calls, and historical records distinguish six new polyploid species of African clawed frog (*Xenopus*, Pipidae) from West and Central Africa. *PLoS ONE*, 10, e0142823.
- EVANS, B. J., KELLEY, D. B., TINSLEY, R. C., MELNICK, D. J. a CANNATELLA, D. C. 2004. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Mol Phylogenet Evol*, 33, 197-213.
- FLAJNIK, M. F., KASAHARA, M., SHUM, B. P., SALTER-CID, L., TAYLOR, E. a DU PASQUIER, L. 1993. A novel type of class I gene organization in vertebrates: a large

- family of non-MHC-linked class I genes is expressed at the RNA level in the amphibian *Xenopus*. *The EMBO Journal*, 12, 4385-4396.
- FORCE, A., CRESKO, W. A., PICKETT, F. B., PROULX, S. R., AMEMIYA, C. a LYNCH, M. 2005. The origin of subfunctions and modular gene regulation. *Genetics*, 170, 433-446.
- FORSDYKE, D. R. 2000. Haldane's rule: Hybrid sterility affects the heterogametic sex first because sexual differentiation is on the path to species differentiation. *Journal of Theoretical Biology*, 204, 443-452.
- FOX, D. T. a DURONIO, R. J. 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*, 140, 3-12.
- GAETA, R. T., PIRES, J. C., INIGUEZ-LUY, F., LEON, E. a OSBORN, T. C. 2007. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell*, 19, 3403-17.
- GANEM, N. J. a PELLMAN, D. 2007. Limiting the proliferation of polyploid cells. *Cell*, 131, 437-40.
- GRAF, J. D. a FISCHBERG, M. 1986. Albumin evolution in polyploid species of the genus *Xenopus*. *Biochem Genet*, 24, 821-37.
- GURDON, J. B. 1962. Developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 10, 622-40.
- GURDON, J. B., LANE, C. D., WOODLAND, H. R. a MARBAIX, G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233, 177-82.
- HELLSTEN, U., HARLAND, R. M., GILCHRIST, M. J., HENDRIX, D., JURKA, J., KAPITONOV, V., OVCHARENKO, I., PUTNAM, N. H., SHU, S., TAHER, L., BLITZ, I. L., BLUMBERG, B., DICHMANN, D. S., DUBCHAK, I., AMAYA, E., DETTER, J. C., FLETCHER, R., GERHARD, D. S., GOODSTEIN, D., GRAVES, T., GRIGORIEV, I. V., GRIMWOOD, J., KAWASHIMA, T., LINDQUIST, E., LUCAS, S. M., MEAD, P. E., MITROS, T., OGINO, H., OHTA, Y., POLIAKOV, A. V., POLLET, N., ROBERT, J., SALAMOV, A., SATER, A. K., SCHMUTZ, J., TERRY, A., VIZE, P. D., WARREN, W. C., WELLS, D., WILLS, A., WILSON, R. K., ZIMMERMAN, L. B., ZORN, A. M., GRAINGER, R., GRAMMER, T., KHOKHA, M. K., RICHARDSON, P. M. a ROKHSAR, D. S. 2010. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, 328, 633-6.
- *HIRSCH, N., ZIMMERMAN, L. B. a GRAINGER, R. M. 2002. *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Dev Dyn*, 225, 422-33.
- HUBBELL, H. R. a HSU, T. C. 1977. Identification of nucleolus organizer regions (NORs) in normal and neoplastic human cells by the silver-staining technique. *Cytogenet Cell Genet*, 19, 185-96.

- HUNT, L. T. a BARKER, W. C. 1988. Relationship of promagainin to three other prohormones from the skin of *Xenopus laevis*: a different perspective. *FEBS Lett*, 233, 282-8.
- CHRISTOFFELS, A., KOH, E. G., CHIA, J. M., BRENNER, S., APARICIO, S. a VENKATESH, B. 2004. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol*, 21, 1146-51.
- JIANG, Z., MICHAL, J. J., BECKMAN, K. B., LYONS, J. B., ZHANG, M., PAN, Z., ROKHSAR, D. S. a HARLAND, R. M. 2011. Development and initial characterization of a HAPPY panel for mapping the *X. tropicalis* genome. *International Journal of Biological Sciences*, 7, 1037-1044.
- KASHIWAGI, K., KASHIWAGI, A., KURABAYASHI, A., HANADA, H., NAKAJIMA, K., OKADA, M., TAKASE, M. a YAOITA, Y. 2010. *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibia. *Exp Anim*, 59, 395-405.
- KEINATH, M. C., VOSS, S. R., TSONIS, P. A. a SMITH, J. J. 2016. A linkage map for the Newt *Notophthalmus viridescens*: Insights in vertebrate genome and chromosome evolution. *Dev Biol*.
- KELLIS, M., BIRREN, B. W. a LANDER, E. S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428, 617-624.
- KHOKHA, M. K., KRYLOV, V., REILLY, M. J., GALL, J. G., BHATTACHARYA, D., CHEUNG, C. Y. J., KAUFMAN, S., LAM, D. K., MACHA, J., NGO, C., PRAKASH, N., SCHMIDT, P., TLAPAKOVA, T., TRIVEDI, T., TUMOVA, L., ABU-DAYA, A., GEACH, T., VENDRELL, E., IRONFIELD, H., SINZELLE, L., SATER, A. K., WELLS, D. E., HARLAND, R. M. a ZIMMERMAN, L. B. 2009. Rapid gynogenetic mapping of *Xenopus tropicalis* mutations to chromosomes. *Developmental Dynamics*, 238, 1398-1346.
- KNYTL, M., KALOUS, L., SYMONOVA, R., RYLKOVA, K. a RAB, P. 2013. Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of a *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 139, 276-83.
- KOBEL, H., LOUMONT, C. a TINSLEY, R. The extant species. Symposia of the Zoological Society of London, 1996. London: The Society, 1960-1999.
- KRETSCHMER, R., GUNSKI, R. J., DEL VALLE GARNERO, A., O'BRIEN, P. C., FERGUSON-SMITH, M. A., OCHOTORENA DE FREITAS, T. R. a CORREA DE OLIVEIRA, E. H. 2015. Chromosome painting in *Vanellus chilensis*: Detection of a fusion common to clade Charadrii (Charadriiformes). *Cytogenet Genome Res*, 146, 58-63.
- KRYLOV, V., KUBICKOVA, S., RUBES, J., MACHA, J., TLAPAKOVA, T., SEIFERTOVA, E. a SEBKOVA, N. 2010. Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. *Chromosome Res*, 18, 431-9.

- KRYLOV, V., MÁCHA, J., TLAPÁKOVÁ, T., TAKÁČ, M. a JONÁK, J. 2003. The c-src1 gene visualized by in situ hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 103, 169-172.
- KRYLOV, V., TLAPAKOVA, T. a MACHA, J. 2007. Localization of the single copy gene Mdh2 on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenet Genome Res*, 116, 110-2.
- KUBICKOVA, S., CERNOHORSKA, H., MUSILOVA, P. a RUBES, J. 2002. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res*, 10, 571-7.
- LEVY, A. A. a FELDMAN, M. 2002. The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology*, 130, 1587-1593.
- LI, X.-Y., ZHANG, Q.-Y., ZHANG, J., ZHOU, L., LI, Z., ZHANG, X.-J., WANG, D. a GUI, J.-F. 2016. Extra microchromosomes play male determination role in polyploid Gibel carp. *Genetics*, 203, 1415-1424.
- LOSICK, V. P. 2016. Wound-induced polyploidy is required for tissue repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 5, 271-278.
- LYNCH, M. a CONERY, J. S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290, 1151-5.
- MATOS, I., MACHADO, M. P., SCHARTL, M. a COELHO, M. M. 2015. Gene expression dosage regulation in an allopolyploid fish. *PLoS One*, 10, e0116309.
- MATTIA, G., VULCANO, F., MILAZZO, L., BARCA, A., MACIOCE, G., GIAMPAOLO, A. a HASSAN, H. J. 2002. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood*, 99, 888-97.
- MECHKARSKA, M., AHMED, E., COQUET, L., LEPRINCE, J., JOUENNE, T., VAUDRY, H., KING, J. D. a CONLON, J. M. 2011. Peptidomic analysis of skin secretions demonstrates that the allopatric populations of *Xenopus muelleri* (Pipidae) are not conspecific. *Peptides*, 32, 1502-1508.
- MERTZ, J. E. a GURDON, J. B. 1977. Purified DNAs are transcribed after microinjection into *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 1502-6.
- MULLER, H. J. 1925. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *The American Naturalist*, 59, 346-353.
- MULLER, W. P. 1977. Diplotene chromosomes of *Xenopus* hybrid oocytes. *Chromosoma*, 59, 273-82.
- NEI, M., ROGOZIN, I. B. a PIONTKIVSKA, H. 2000. Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10866-71.
- NOWAK, M. A., BOERLIJST, M. C., COOKE, J. a SMITH, J. M. 1997. Evolution of genetic redundancy. *Nature*, 388, 167-171.

- OTA, T. a NEI, M. 1995. Evolution of immunoglobulin VH pseudogenes in chickens. *Mol Biol Evol*, 12, 94-102.
- PATERSON, A. H., BOWERS, J. E. a CHAPMAN, B. A. 2004. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 9903-9908.
- PINKEL, D., STRAUME, T. a GRAY, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 2934-2938.
- PIPERIDIS, N. 2014. GISH: resolving interspecific and intergeneric hybrids. *Methods Mol Biol*, 1115, 325-36.
- POLACK, S. S. 1949. The *Xenopus* pregnancy test. *Canadian Medical Association Journal*, 60, 159-161.
- RACK, K., VIDREQUIN, S. a DARGENT, J. L. 2016. Genomic profiling of myeloma: the best approach, a comparison of cytogenetics, FISH and array-CGH of 112 myeloma cases. *J Clin Pathol*, 69, 82-6.
- RASTOGI, S. a LIBERLES, D. A. 2005. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evolutionary Biology*, 5, 28-28.
- ROUQUIER, S., BLANCHER, A. a GIORGI, D. 2000. The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: Evidence for reduction of the functional fraction in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 2870-2874.
- SEMON, M. a WOLFE, K. H. 2008. Preferential subfunctionalization of slow-evolving genes after allopolyploidization in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8333-8.
- *SCHMID, M., EVANS, B. J. a BOGART, J. P. 2015a. Polyploidy in Amphibia. *Cytogenet Genome Res*, 145, 315-30.
- SCHMID, M., HAAF, T. a SCHEMPP, W. 1985. Chromosome banding in Amphibia. IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma*, 91, 172-84.
- SCHMID, M. a STEINLEIN, C. 1991. Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma*, 101, 123-32.
- *SCHMID, M. a STEINLEIN, C. 2015. Chromosome banding in Amphibia. XXXII. The genus *Xenopus* (Anura, Pipidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 145, 201-217.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., YANO, C. F. a CIOFFI, M. B. 2015b. Hypermethylated chromosome regions in nine fish species with heteromorphic sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 147, 169-78.
- SCHWEIZER, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 27, 190-193.

- SILVA, F. A., CARVALHO, N. D., SCHNEIDER, C. H., TERCENIO, M. L., FELDBERG, E. a GROSS, M. C. 2016. Comparative cytotaxonomy of two species of fish from the genus *Satanoperca* reveals the presence of a B chromosome. *Zebrafish*, 13, 354-9.
- SIMMON, K. E., STEADMAN, D. D., DURKIN, S., BALDWIN, A., JEFFREY, W. H., SHERIDAN, P., HORTON, R. a SHIELDS, M. S. 2004. Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 143-149.
- SPEMANN, H. a MANGOLD, H. 2001. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *International Journal of Developmental Biology*, 45, 13-38.
- SPRING, J. 1997. Vertebrate evolution by interspecific hybridisation – are we polyploid? *FEBS Letters*, 400, 2-8.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75, 304-306.
- TLAPAKOVA, T., KRYLOV, V. a MACHA, J. 2005. Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes. *Chromosome Res*, 13, 699-706.
- TYMOWSKA, J. 1973. Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, Pipidae. *Cytogenet Cell Genet*, 12, 297-304.
- TYMOWSKA, J. 1991. Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. In: SESSIONS, S. K. (ed.) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. San Diego: Academic Press.
- TYMOWSKA, J. a FISCHBERG, M. 1982. A comparison of the karyotype, constitutive heterochromatin, and nucleolar organizer regions of the new tetraploid species *Xenopus epitropicalis* Fischberg and Picard with those of *Xenopus tropicalis* Gray (Anura, Pipidae). *Cytogenet Cell Genet*, 34, 149-57.
- UNO, Y., NISHIDA, C., TAKAGI, C., IGAWA, T., UENO, N., SUMIDA, M. a MATSUDA, Y. 2015. Extraordinary diversity in the origins of sex chromosomes in Anurans inferred from comparative gene mapping. *Cytogenetic and Genome Research*, 145, 218-229.
- UNO, Y., NISHIDA, C., TAKAGI, C., UENO, N. a MATSUDA, Y. 2013. Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole-genome duplication. *Heredity*, 111, 430-436.
- WANG, X., SHI, X., HAO, B., GE, S. a LUO, J. 2005. Duplication and DNA segmental loss in the rice genome: implications for diploidization. *New Phytol*, 165, 937-46.
- *WOLFE, K. a Ó'HUIGÍN, C. 2016. Significance of positive selection and gene duplication in adaptive evolution: in memory of Austin L. Hughes. *Immunogenetics*, 1-5.

- YAKOVLEV, G. I., SORRENTINO, S., MOISEYEV, G. P. a LIBONATI, M. 1995. Double-stranded RNA: the variables controlling its degradation by RNases. *Nucleic Acids Symp Ser*, 106-8.
- ZHAN, S. H., DRORI, M., GOLDBERG, E. E., OTTO, S. P. a MAYROSE, I. 2016. Phylogenetic evidence for cladogenetic polyploidization in land plants. *Am J Bot.*
- ZOU, F. a LI, N. 2012. Isolation and characterization of sixty sequences of cot-1 DNA from the Asiatic black bear, *Ursus thibetanus*. *African Journal of Biotechnology*, 11, 15493-15500.

Seznam online zdrojů

Appliedgenetics.com. (2016). *Hybloc™ Competitor DNA (i.e., Cot-1 DNA®) :: Applied Genetics Laboratories, Inc.* [online] Dostupné z: <http://www.appliedgenetics.com/products/hybloc-competitor-dna/> [cit. 2016-08-12].

Genomesize.com. (2016). *Animal Genome Size Database:: Species Record.* [online] Dostupné z: http://www.genomesize.com/result_species.php?id=744 [cit. 2016-08-06].

Metasystems.com (2016). *Ikaros Karyotyping System / MetaSystems.* [online] Metasystems-international.com. Dostupné z: <https://metasystems-international.com/en/products/ikaros/> [cit. 2016-08-13].

Thermofisher.com. (2016a). *Cot-1 DNA® Blocking Reagent | Thermo Fisher Scientific.* [online] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/gene-expression-analysis-genotyping/genotyping-genomic-profiling/genomic-profiling-acgh/cot-1-dna.html> [cit. 2016-08-12].

Thermofisher.com. (2016b). *Salmon Sperm DNA, sheared (10 mg/mL) - Thermo Fisher Scientific.* [online] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM9680> [cit. 2016-08-12].

Uniprot.org. (2016). *Xenopus.* [online] Dostupné z: <http://www.uniprot.org/taxonomy/8353> [cit. 2016-07-21].

Wikipedia. (2016). *Fluorescence in situ hybridization.* [online] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_in_situ_hybridization [cit. 2016-07-30].

Xenbase.org. (2016). *Xenopus laevis stage series: complete - Xenbase | A Xenopus laevis and Xenopus tropicalis resource.* [online] Dostupné z: <http://www.xenbase.org/anatomy/alldev.do> [cit. 2016-07-26].

Přílohy

1. The evidence for the origin of *Xenopus mellotropicalis* via independent polyploidization event revealed by Zoo-FISH - Knytl *et al.*